

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**Estructura y diversidad de la población de "*Streptococcus suis*" presente en el ganado porcino, jabalí y conejo silvestre**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**Verónica Sánchez del Rey**

Directores

Ana Isabel Vela Alonso  
José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández  
Víctor Briones Dieste

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Servicio de Diagnóstico, Identificación y Caracterización Molecular



## TESIS DOCTORAL

### **Estructura y diversidad de la población de *Streptococcus suis* presente en el ganado porcino, jabalí y conejo silvestre**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Verónica Sánchez del Rey**

Bajo la dirección de los Doctores:

Ana Isabel Vela Alonso, José Francisco Fernández-Garayzábal

Fernández y Víctor Briones Dieste

Madrid, 2015





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

Dña. Ana Isabel Vela, Profesora Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, D. José Francisco Fernández-Garayzábal, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y D. Víctor Briones, Director del Centro de Investigación en Sanidad Animal-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral que lleva por título “Estructura y diversidad de la población de *Streptococcus suis* presente en el ganado porcino, jabalí y conejo silvestre” ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. Verónica Sánchez del Rey en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Madrid, 2015

Los Directores de la Tesis Doctoral

Ana I. Vela

José F. Fernández-Garayzábal

Víctor Briones



*A MIS PADRES*



*“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.”*

*(Louis Pasteur)*

*"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha  
pensado."*

*(Albert Szent-Györgi)*





## Agradecimientos

El camino ha sido duro y difícil, lleno de subidas y bajadas, pero lo he disfrutado muchísimo, sin duda ha merecido la pena. Durante estos años han sido muchas las personas que han participado en este trabajo. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi agradecimiento a todas aquellas que me han ayudado o acompañado en este largo camino.

En primer lugar, quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia, la concesión de la Beca del Programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) y al proyecto AGL2009-14303-C02-01 dentro del Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental, que me han permitido realizar la Tesis Doctoral. Además, dar las gracias a aquellas personas que nos han suministrado muestras por su importantísima colaboración: al Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos y la Dra. Carmen Bárcena del Centro VISAVET, al Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge de la Universidad Autònoma de Barcelona y a la Federación Madrileña de Caza.

Mi más sincero agradecimiento a mis Directores, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis. A Víctor, por introducirme en el mundo de la investigación científica y acercarme al maravilloso mundo visavetiano. A José, por las largas discusiones científicas de las que tanto he aprendido, por dar una visión tan crítica y acertada a los artículos y por supuesto, por poner una nota de humor en todas nuestras reuniones. Mi especial agradecimiento a Anabel por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto, por guiarme en todo momento y por su gran paciencia, esfuerzo y dedicación con esta Tesis. Gracias por tus consejos y estar siempre dispuesta a escucharme, sin duda, me llevo un gran recuerdo de todas nuestras charlas.

Me gustaría transmitir mi agradecimiento a Lucas Domínguez, por permitirme formar parte de su equipo, ofrecerme la oportunidad de trabajar en uno de los

mejores laboratorios y transmitir día a día esa energía y entusiasmo por la investigación a todos y cada uno de los que formamos parte de este centro. Y por supuesto, mi agradecimiento a muchos de los profesores del Departamento de Sanidad Animal y de VISAVET que me han sabido aconsejar y ofrecido su ayuda durante estos años, a Miguel Angel Moreno, Lucía de Juan, Alicia Aranaz, Joaquín Goyache, Concha Porrero, Ana Mateos, Antonio Rodríguez Bertos, Mar Blanco...

Gracias a todo el equipo de “Swine Infectious Disease Research Centre” de la Universidad de Montreal, por todo lo enseñado y aprendido durante mi estancia. En especial, mil gracias a Marcelo, por acogerme como una más en tu grupo de investigación, por valorarme y hacer de mi estancia en Canadá una de las mejores experiencias de mi vida. Gracias también a Mariela, por ser ambos tan cariñosos y atentos conmigo.

Mi más cariñoso agradecimiento a toda la gente que forma o ha formado parte de la gran familia de VISAVET, porque entre todos hacéis del laboratorio un lugar especial.

Mil gracias a mis chicas del Servicio de Diagnóstico, Identificación y Caracterización Molecular, Leydis, Almu, Eli, y a todos con los que han pasado en algún momento por nuestro grupo, Elvira, Noelia, Alberto, Lucía, Sonia y Rafa. Gracias por los innumerables y buenos recuerdos que me llevo, porque incluso en las peores situaciones siempre hemos encontrado un hueco para reírnos. Gracias por enseñarme infinidad de cosas, echarme una mano siempre que lo he necesitado y por hacer del despacho mi segundo hogar ¡Sois los mejores compañeros que uno puede tener!

Gracias a Carmiña por las infinitas llamadas de ánimo para ver cómo iba la escritura de esta Tesis, recibirme siempre con un cariñoso abrazo y por estar siempre ahí. A Cris por escucharme y estar siempre dispuesta a ayudarme en todo. A Marisa por esa risa contagiosa que siempre me anima y ayudarme con mis dudas de estadística. Como nuestra gran familia ha crecido tanto, no puedo nombrar a todos y cada uno de vosotros, así que gracias a todos mis compañeros de los

Servicios que forman parte del Centro VISAVET: de Calidad y Bioseguridad, de Zoonosis de Transmisión Alimentaria y Resistencia a Antimicrobianos, de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos, de Micobacterias, de Anatomía Patológica, Veterinario de Asistencia Ganadera, Veterinario de Urgencia de Madrid, VISAVET-BRUKER de Espectrometría de Masas, de Ómica, de Gestión, Recursos Humanos y Docencia, y en especial gracias a los informáticos por sacarme de tantos apuros con el ordenador. Gracias a todos con los que he compartido salidas, bailoteos y risas que han hecho más amena esta última etapa y a todos con los que he compartido cafés, comidas y momentos de pasillo que me han alegrado el día a día durante todos estos años.

Mil gracias a Adriana, Paola y Carmen, por ser grandes amigas y hacerme siempre reír, me encanta pasar el tiempo con vosotras. Gracias por las interminables charlas telefónicas, por aguantarme en mis momentos de estrés y por vuestras palabras de ánimo a diario en esta última fase ¿Cómo lo llevas? ¡Vamos que ya no queda nada! No os imagináis lo importante que ha sido vuestro apoyo en los últimos meses ¡Gracias chicas!

Gracias a toda la gente maravillosa que he conocido durante mi aventura canadiense y que no olvido. En especial a mis amigos canadienses-españoles. A Sandra, por ser mi apoyo en Saint-Hyacinthe ¡No sé que hubiera hecho sin ti! A Tatiana y Tristán, por acogerme todos los fines de semana en su casa de Montreal y enseñarme esa increíble ciudad. Me alegro infinito de teneros de vuelta en Madrid.

Gracias a mis amigos tricantinos. Gracias Patri, qué decirte, después de todos estos años, hemos vivido tantas cosas juntas que no sabría por dónde empezar, gracias por todo lo que hemos compartido ¡Y lo que nos queda! Gracias por escucharme, animarme y estar a mi lado, en los mejores y peores momentos de mi vida. A Víctor, por sacarme siempre una sonrisa, por tus notas de humor incluso en las situaciones más difíciles y transmitirme siempre tu optimismo. Gracias chicos por adoptarme tantas veces en vuestra casa. A Luis, Manu, Javi y Miri, por la inmensidad de noches de risas compartidas en el Escorpión. Gracias, porque

aunque ajenos al mundo científico, siempre me habéis dedicado un ¿Qué tal va esa Tesis? ¡Gracias vecinos!

Gracias a mi grupo de amigos veterinarios, Elena, Lucía, Ana Luisa, Ana, Almudena, Elba, Eleni, Gonzalo y a Alex, que además me ha acompañado en parte de mi aventura visavetiana. Vosotros hicisteis que los años de Universidad hayan sido los mejores. Las prácticas, los exámenes y la cafetería sin vosotros no hubieran sido igual ¡Os debo los mejores recuerdos! Gracias porque aunque cada uno hemos elegido caminos muy diferentes y a muchos nos separan miles de kilómetros, siempre encontramos un hueco para juntarnos ¡Espero que sigamos con nuestros viajes veraniegos! Talia, no me olvido de ti, gracias por tener siempre esa alegría que contagia a cualquiera. Mil gracias a los que me han acompañado y animado en estos últimos meses ¡Gracias amigos, sois geniales!

Gracias a “mi lindo bicho” Mico, por todas las horas que has pasado en mi escritorio bajo la luz de mi flexo haciéndome compañía ¡Te sigo echando de menos!

Estas últimas líneas se las dedico a mi familia, lo más importante del mundo. A mis padres, Pedro y Rosa, por ser como sois, por vuestra paciencia infinita y apoyo incondicional, por no dejarme caer y siempre darme fuerzas para seguir adelante, por todo el amor que me habéis transmitido. Gracias por confiar en mí y por enseñarme que con fuerza de voluntad se puede conseguir todo lo que uno se propone, sin vosotros nunca hubiera llegado hasta aquí, sois maravillosos y mi ejemplo a seguir. No tengo palabras para expresar todo lo que siento, gracias a vosotros soy lo que soy ¡papis os quiero con locura!

A mi hermano, Pedro Pablo, por todo el cariño y comprensión que me has transmitido durante estos años. Gracias por esa paciencia, calma y templanza que te caracterizan, por estar ahí siempre que lo he necesitado y brindarme tu ayuda en todo momento. Gracias por todas las risas compartidas desde pequeños y esos increíbles viajes de hermanos. Eres el mejor, ¡te quiero muchísimo! A mi cuñada Marta, gracias por formar parte de nuestra familia y traer siempre una sonrisa a nuestra casa. ¡Gracias a los dos por traer a mi sobrino Jorge!

Gracias a mis tíos, por siempre darme palabras de apoyo. A mis abuelos, que no han podido ver este trabajo pero espero que se sientan muy orgullosos de su nieta.

Y gracias a todas las personas que han pasado por mi vida estos años y que no puedo nombrar porque no acabaría nunca, todos vosotros habéis aportado un granito de arena en esta Tesis.

Ahora termina esta etapa de mi vida, pero inicio la siguiente con una sonrisa y muchas expectativas. Gracias, sin la ayuda de todos vosotros no lo hubiera conseguido, ha sido un verdadero placer compartir estos años con todos vosotros.

!!!!GRACIAS!!!!



# Índice

Resumen.....	17
Summary .....	25
Capítulo I: Introducción.....	31
1. <i>Streptococcus suis</i> .....	33
1.1. Características generales del microorganismo .....	33
1.1.1. Antecedentes históricos .....	33
1.1.2. Encuadre taxonómico .....	34
1.1.3. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. ....	35
1.1.4. Ecología .....	36
1.2. Factores de virulencia .....	37
1.2.1. Factores clásicos de virulencia .....	38
1.2.2. Otros factores asociados a la virulencia.....	43
1.3. Métodos de caracterización de <i>S. suis</i> .....	51
2. Infección por <i>S. suis</i> en animales .....	58
2.1. Infección por <i>S. suis</i> en el cerdo.....	58
2.1.1. Sector porcino español.....	58
2.1.2. Epidemiología.....	60
2.1.3. Sintomatología.....	62
2.1.4. Diagnóstico .....	63
2.1.5. Tratamiento y prevención de la infección.....	66
2.1.6. Caracterización de <i>S. suis</i> .....	68
2.2. Infección por <i>S. suis</i> en otros animales .....	81
3. Infección por <i>S. suis</i> en el hombre.....	83
Capítulo II: Objetivos .....	87
Capítulo III: Resultados.....	91



Capítulo III.I: Caracterización de aislados de <i>S. suis</i> procedentes de conejo silvestre y jabalí en España.....	93
Estudio 1.....	97
Estudio 2.....	101
Capítulo III.II: Tipificación molecular de aislados de <i>S. suis</i> procedentes de cerdo ibérico. Comparación con aislados de cerdo blanco criado en intensivo.....	109
Capítulo III.III: Detección de genes asociados a la virulencia en aislados de <i>S. suis</i> procedentes de ganado porcino y animales silvestres .....	121
Capítulo IV: Discusión.....	141
Capítulo V: Conclusiones .....	157
Capítulo VI: Bibliografía .....	161

## Resumen

---



## **Estructura y diversidad de la población de *Streptococcus suis* presente en el ganado porcino, jabalí y conejo silvestre**

*Streptococcus suis* es un patógeno de especial relevancia en la industria porcina, debido a su elevada prevalencia y a las graves pérdidas económicas que origina derivadas de los diversos procesos clínicos que produce, como meningitis, septicemias, artritis o proceso respiratorios.

La mayoría de los estudios de caracterización de *S. suis* se han realizado en el cerdo (*Sus scrofa domesticus*), que en términos generales podríamos denominar como “cerdo blanco” y que incluiría todas las razas y cruces que se explotan habitualmente en condiciones de cría intensiva. Sin embargo no hay datos, o estos son muy limitados, respecto a la distribución y características de las poblaciones de *S. suis* en otros posibles hospedadores, que son necesarios para conocer el posible papel que estos pueden representar en la epidemiología de este patógeno.

El cerdo ibérico es una raza de cerdo autóctona de la Península Ibérica cuyo sistema de producción (montanera) está altamente adaptado al ecosistema mediterráneo y en el cual los animales se crían al aire libre en la dehesa. En la actualidad, también se crían de manera intensiva (cebo). Sin embargo, a pesar de la importancia económica y del fuerte crecimiento de este sector dentro de la producción ganadera española no existen datos sobre la frecuencia de aislamiento y caracterización de *S. suis* en estos animales. Por otra parte, la fauna silvestre desempeña un papel importante en el mantenimiento y la diseminación de determinados patógenos. El jabalí (*Sus scrofa*) y el conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) son dos especies de importancia ecológica y/o cinegética en nuestro país. Sin embargo, en España no se disponía, al igual que en el caso del cerdo ibérico, de información relativa a la presencia y distribución de *S. suis* en las mismas.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral investigamos la presencia de *S. suis* en el cerdo ibérico, el jabalí y el conejo silvestre, y realizamos la caracterización de los aislados, con el objetivo de determinar la posible relación existente entre estos y los

obtenidos de ganado porcino (cerdo blanco) y así establecer el papel que dichos animales pueden desempeñar en la epidemiología de este patógeno. Determinamos el serotipo de los aislados de *S. suis* y realizamos su caracterización genética mediante las técnicas de electroforesis de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), secuenciación de múltiples genes (*Multilocus Sequence Typing*, MLST), análisis de varios locus que contienen un número variable de repeticiones en tándem (*Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*, MLVA) y el genotipado basado en los perfiles (presencia/ausencia) de determinados genes (*epf*, *sly*, *mrp*, *sao*, *impdh*, *covR*, *srtA*, *dpp* y *dltA*) asociados con la virulencia de *S. suis*.

*S. suis* se aisló aproximadamente de la mitad (48,4%) de las tonsilas de los cerdos ibéricos estudiados, confirmando la amplia distribución de *S. suis* en la población de cerdo ibérico. La cuarta parte de los aislados tonsilares de *S. suis* pertenecieron a los serotipos 1, 2 y 9, serotipos habitualmente detectados en la población de cerdo blanco de nuestro país. Mediante coaglutinación se identificaron 19 serotipos adicionales, resultado que demuestra la elevada diversidad de la población de *S. suis* en el cerdo ibérico. El estudio incluyó cerdos ibéricos criados en montanera y en cebo para analizar el posible efecto que el sistema de explotación (extensivo/intensivo) pudiera tener en la población de este patógeno. Sin embargo, no se encontraron diferencias ni en la frecuencia de aislamiento de *S. suis* entre los cerdos de montanera y cebo (51,4% y 45,1%, respectivamente) ni en la diversidad de serotipos detectados en ambos grupos de cerdos, lo que sugiere que el sistema de explotación no afectaría a la capacidad de colonización de *S. suis*. En el estudio se incluyeron también aislados clínicos procedentes de cerdo ibérico de cebo. Dichos aislados pertenecieron en su mayoría al serotipo 2, al igual que en el cerdo blanco en nuestro país.

*S. suis* se aisló del 39,1% de los jabalíes estudiados, resultado que confirma el papel de estos animales como reservorio de este patógeno. El porcentaje de conejos silvestres portadores de *S. suis* fue también relativamente elevado (33,3%). Este dato es especialmente significativo si consideramos que *S. suis* es un patógeno típico del ganado porcino y que constituye la primera descripción de aislamiento de este

microorganismo en conejos silvestres. El serotipo 9 fue el más frecuente entre los aislados de jabalí y conejo silvestre (12,5% y 86,2%, respectivamente); sin embargo, el serotipo 2 fue minoritario (0,3 y 0%, respectivamente) en ambas especies. La marcada predominancia de serotipo 9 sobre el serotipo 2 entre los aislados procedentes de jabalí y conejo silvestre sugiere características diferentes entre las poblaciones de *S. suis* procedentes de dichas especies silvestres y del ganado porcino.

Los estudios de caracterización genética se centraron fundamentalmente en los aislados de los serotipos 2 y 9, responsables de la mayor parte de procesos clínicos en el cerdo blanco en España. El poder de discriminación (D) de las cuatro técnicas utilizadas (PFGE, MLST, MLVA y la técnica basada en la detección de genes asociados a la virulencia) en la caracterización de aislados porcinos, fue de D=0,96, D=0,67, D=0,81 y D=0,80, respectivamente. Estas dos últimas técnicas, aunque son ligeramente menos discriminatorias que la técnica PFGE, poseen una serie de ventajas (rapidez, sencillez de realización e interpretación, coste asequible o la posibilidad de elaborar bases de datos fundamentadas en perfiles asociados a códigos numéricos que permiten la comparación de resultados entre laboratorios), lo cual hace que ambas constituyan herramientas moleculares adecuadas para la caracterización de *S. suis*.

Los aislados de *S. suis* de cerdo ibérico presentaron una diversidad genética moderada mediante PFGE (GD=0,48), valor similar al observado previamente en el cerdo blanco. Esta diversidad genética se confirmó mediante las técnicas MLVA y MLST, detectándose 23 y 16 perfiles diferentes, respectivamente. Los aislados de *S. suis* de jabalí mostraron por PFGE una diversidad genética mayor a la observada en el ganado porcino (GD=0,94) con 47 pulsotipos diferentes, la mayoría de los cuales estuvo representado por un único aislado, y 37 perfiles alélicos nuevos mediante MLST. Por el contrario, los aislados tonsilares de conejo silvestre presentaron una baja diversidad genética por PFGE (5 pulsotipos diferentes; GD=0,09), resultado que pudiera estar relacionado con el hecho de que los conejos procedían de un área geográfica relativamente limitada o porque se tratase de clones

que se encuentren adaptados a esta especie animal, tal y como ha sido descrito para otras especies bacterianas.

Independientemente de la técnica de caracterización utilizada, los aislados de serotipo 2 y 9 presentaron claras diferencias genéticas. Los aislados de ambos serotipos se asignaron a grupos genéticos diferentes mediante PFGE, MLVA y la técnica basada en la detección de genes asociados a la virulencia. Respecto a los perfiles de genes asociados a la virulencia (VP), ninguno de los aislados de serotipo 2 mostraron un perfil en común con los aislados de serotipo 9. Además, encontramos una asociación estadística entre las variantes *saoL* y *saoM* con los serotipos 9 y 2, respectivamente. El análisis MLST también corroboró dichas diferencias; la mayoría de los aislados porcinos de serotipo 2 (87,5%) se asignaron al perfil alélico ST1, mientras que los aislados de serotipo 9 (72,2%) se asignaron a los perfiles alélicos ST123 y ST125.

Los aislados de *S. suis* de cerdo ibérico fueron bastante similares a los del cerdo blanco, principalmente respecto a los aislados clínicos. Todos los aislados clínicos de serotipo 2, de cerdo blanco e ibérico, a excepción de un aislado, fueron asignados al perfil alélico ST1, clon responsable de la mayoría de los casos clínicos producidos por este serotipo en Europa. El único aislado clínico de serotipo 9 de cerdo ibérico fue asignado al perfil alélico ST123 y todos los aislados clínicos de cerdo blanco de este serotipo, a excepción de un aislado, fueron asignados a los perfiles alélicos ST123 o ST125, resultado que coincide con lo descrito previamente en España.

Los aislados porcinos y los de jabalí y conejo silvestre presentaron diferencias en sus características genéticas. Los aislados procedentes de ganado porcino no presentaron por PFGE ningún pulsotipo en común con los aislados procedentes de ambas especies silvestres. Del mismo modo, mediante MLST, los perfiles alélicos asignados a los aislados de jabalí y conejo silvestre no presentaron ninguna relación genética, ni entre ellos, ni con los perfiles alélicos encontrados entre los aislados porcinos. La técnica basada en la detección de genes asociados a la virulencia también evidenció estas diferencias. Los genes *epf*, *shy*, *mrp*, *sao* y *dltA* no se

detectaron en la mayoría de los aislados de jabalí y conejo silvestre, sin embargo, estuvieron presentes en la mayoría de los aislados de cerdo. Además, entre los 31 VP identificados, únicamente dos estuvieron presentes tanto en aislados porcinos como en los procedentes de las especies silvestres. Asimismo, los perfiles detectados más frecuentemente entre los aislados de *S. suis* en el cerdo (VP16 y VP26) fueron distintos a los frecuentes encontrados en las especies silvestres (VP7 y VP8). Estos perfiles estuvieron asociados con determinados genotipos detectados por MLST. El perfil VP26 estuvo asociado al genotipo ST1 presente en la mayoría de los aislados clínicos (71,4%) y aproximadamente la mitad (45%) de los aislados tonsilares de serotipo 2 de cerdo. El perfil VP16 estuvo asociado a los genotipos ST123 y ST125 que incluyeron más de la mitad (60,7%) de los aislados clínicos de cerdo de serotipo 9. Los perfiles VP7 y VP8 estuvieron asociados al ST216. Estos resultados ponen de manifiesto que la población de *S. suis* presente en las especies silvestres investigadas no se encuentra relacionada con la presente en el ganado porcino.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han permitido esclarecer varios aspectos sobre la epidemiología de *S. suis*. Así, se confirma el papel del jabalí como reservorio y se describe por primera vez el papel del conejo silvestre como un nuevo reservorio de *S. suis*. Sin embargo, la caracterización molecular de los aislados de ambas especies silvestres indica que estos no están relacionados genéticamente con los clones detectados en el ganado porcino tanto en España como en el resto de países europeos, y por lo tanto, ambas especies no representan un riesgo potencial para la cabaña ganadera porcina de nuestro país.





## Summary

---



## **Population structure and diversity of *Streptococcus suis* from swine, wild boar and wild rabbit**

*Streptococcus suis* is one of the most important swine pathogens in modern swine production worldwide. In pigs, the most important clinical features associated with *S. suis* are meningitis, septicemia, arthritis or pneumonia. In addition to its sanitary and economic relevance in the swine industry, this pathogen is also an important zoonotic agent responsible for severe clinical diseases in humans.

Many studies have been concentrated on intensively-farmed pigs of various common breeds (common breed pigs, CBP). However, there are limited data on the distribution and characteristics of *S. suis* in other potential hosts, being necessary to investigate the potential role they can play in the epidemiology of this pathogen. The Iberian pig (IP) is a traditional breed of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*), native to the Iberian Peninsula and highly adapted to the Mediterranean ecosystem. In traditional management systems (“*montanera*”, MIP), IPs are reared outdoors in sparse oak forests (“*dehesa*”), but IP is now also being produced indoors (“*cebo*”, CIP). Despite the economic importance of their high-value dry-cured products in national and international markets, there are no data on the carriage rates and diversity of this pathogen in IP. On the other hand, wild animals can be reservoir of relevant pathogens for livestock and humans. Several emerging infectious diseases, including zoonoses, were shown to originate from wildlife. Wild boar (*Sus scrofa*) and the wild European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are species of ecological and economic importance in our country. However, there is little information available concerning the distribution of *S. suis* in these wild animals species.

The aim of this work was investigated the population of *S. suis* carried by IP, wild boars and wild rabbit and compared them with CBP, in order to determine the relationship between them and the role they may play in the epidemiology of this pathogen. Thus, we investigated the presence of *S. suis* and isolates were further

characterized by serotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and virulence-associated gene profiles based on the presence/absence of certain genes (*epf*, *shy*, *mrp*, *sao*, *impdh*, *covR*, *srtA*, *dpp* and *dltA*).

*S. suis* was recovered from 48.4% of the IP examined, indicating that is relatively widely distributed among IP animals. A quarter of *S. suis* tonsillar isolates could be typed as capsular types 1, 2 or 9, which are usually detected among CBP in our country. The remaining *S. suis* isolates were serotyped using coagglutination and 19 additionally serotypes were detected, showing the high diversity of the *S. suis* population in IP. The study included isolates from MIP reared outdoors and CIP reared indoors in order to evaluate the effect of different farming practices on the epidemiology of *S. suis*. No significant differences in carrier rates (51.4% in MIP and 45.1% in CIP) or serotype diversity were observed between MIP and CIP, indicating that intensive farming does not influence *S. suis* colonization. The study also included clinical isolates from CIP being most of them of serotype 2, which is in agreement with the results observed in Spanish CBP.

*S. suis* was isolated from 39.1% of wild boars. This result confirms the role of these animals as a reservoir of *S. suis*. One third of wild rabbits examined (33.3%) in this study were colonized by *S. suis*. This percentage is significantly high considering that wild rabbit is an animal species far from pigs, being the first report of isolation of *S. suis* in wild rabbits. Serotype 9 was the most prevalent among wild boar and wild rabbit isolates (12.5% and 86.2%, respectively) while serotype 2 was rarely detected (0.3% and 0%, respectively) in both animal species. The predominance of serotype 9 over serotype 2 suggests that *S. suis* population from these wild animals and pigs have distinct genetic background.

Typing analysis was focused on serotype 2 and 9 isolates of *S. suis* because these serotypes are the most commonly associated serotypes with swine disease in Spain. The discriminatory power of the typing methods (PFGE, MLST, MLVA and technique based on the detection of virulence associated genes) was  $D=0.96$ ,  $D=0.67$ ,  $D=0.81$  and  $D=0.80$ , respectively. Although MLVA and technique based

on the detection of virulence associated genes showed a slightly lower discriminatory power than PFGE, both techniques display certain advantages over PFGE, such as they are rapid, easy to perform, comparatively inexpensive and enabling easier inter-laboratory comparisons. Therefore, both techniques may be useful tools for characterizing *S. suis* in epidemiological studies.

*S. suis* IP isolates showed a moderate genetic diversity by PFGE (GD=0.48). This value was similar to that observed by other authors investigating carrier prevalence in CBP. This diversity was in agreement with the results obtained by MLVA (23 different profiles) and MLST (16 different allelic profiles). *S. suis* wild boar isolates showed a higher genetic diversity by PFGE (GD=0.94). Isolates displayed 47 different pulsotypes being most of them represented by unique isolates. This genetic heterogeneity was also observed by MLST analysis with *S. suis* isolates being assigned to 37 new allelic profiles. Nevertheless, tonsillar isolates from wild rabbits showed a low degree of genetic diversity (GD 0.09). This result may be related to the fact that these animals were collected from a relatively small geographic area or because these isolates could represent clones restricted to the wild rabbit population examined as it has been observed in other pathogens.

Regardless of the molecular typing technique used, serotype 2 and 9 isolates showed different genetic characteristics. Isolates of both serotypes were assigned to different clusters by PFGE, MLVA and technique based on the detection of virulence associated genes. None of the isolates of serotype 2 and 9 showed common VP profiles. Moreover, there was a correlation between the variant of the *sao* gene, M and L, and the serotypes 2 or 9, respectively. MLST analysis also confirmed these differences; most of the pig isolates of serotype 2 (87.5%) were assigned to allelic profile ST1, while isolates of serotype 9 (72.2%) belonged to ST123 and ST125.

IP isolates were quite similar to those from CBP, in particular clinical isolates. All but one of the clinical isolates of serotype 2 from IP and CBP were assigned to allelic profile ST1, clone responsible for a high proportion of *S. suis* pig diseases in Europe. The only clinical isolate of serotype 9 from IP belonged to the allelic

profile ST123 and all but one of the clinical isolates from CBP were assigned to the allelic profiles ST123 or ST125. These allelic profiles have been already associated to clinical *S. suis* isolates from CBP in Spain.

Genetic differences between pig and wild animal (wild boar and wild rabbit) isolates were observed. No common pulsotypes were detected between pig and wild animal isolates by PFGE. Similarly, the allelic profiles detected in wild animals were not genetically related to those usually associated with pigs by MLST. The technique based on the detection of virulence associated genes also showed these differences. A great majority of the *S. suis* isolates from both wild animal species lacked the *epf*, *shy*, *mrp*, *sao* and *dltA* genes, but these genes were present in most pig isolates. Moreover, only two out of thirty-one VPs detected included isolates from both pig and wild animals. VP7 and VP8 were more frequently detected in wild animals while VP16 and VP26 were the most prevalent among pig isolates. A significant correlation between particular VPs and STs was observed. Thus, VP26 was associated to ST1 including nearly three-quarters (71.4%) of the clinical and 45% of the tonsillar pig isolates of serotype 2. On the other hand, VP16 included many (60.7%) of the clinical pig isolates of serotype 9 and was associated with ST123 or ST125. VP7 and VP8 were associated to ST216. These results suggest that the population of *S. suis* from wild animals is not related to *S. suis* population from pigs.

The results of this Thesis may lead to a better understanding of the epidemiology of *S. suis*. Our studies confirm the role of wild boars as a reservoir of *S. suis* and describe the isolation of *S. suis* from wild rabbits for the first time. However, further characterization of *S. suis* isolates from both wild animal species indicates that they are genetically unrelated to the prevalent clones usually detected in pigs in Spain and other European countries and therefore they might not represent a potential risk for pigs.

# Capítulo I

## Introducción

---





## 1. *Streptococcus suis*

### 1.1 Características generales del microorganismo

#### 1.1.1 Antecedentes históricos

*Streptococcus suis* es un importante patógeno porcino que causa grandes pérdidas económicas en la industria a nivel mundial. Este microorganismo produce una gran variedad de procesos patológicos en el cerdo (*Sus scrofa domesticus*) incluyendo meningitis, artritis, neumonía, septicemia, endocarditis, poliserositis y abscesos (Gottschalk, 2012). Asimismo, *S. suis* es un agente zoonótico que causa serias afecciones en el hombre, principalmente meningitis, siendo la principal vía de transmisión el contacto estrecho con cerdos infectados o con productos derivados del mismo. Las personas que por su profesión entran en contacto con estos animales (ganaderos, trabajadores de mataderos, veterinarios) constituyen el principal grupo de riesgo de la enfermedad (Arends y Zanen, 1988; Gottschalk y col., 2007; Gottschalk y col., 2010).

Las primeras infecciones por *S. suis* fueron notificadas en los años 50 (Jensen y van Dorssen, 1951; Field y col., 1954). En el año 1951, Jensen y van Dorssen describieron brotes de meningoencefalitis en ganado porcino en varias provincias de los Países Bajos. Posteriormente en el año 1954, Field y col. describieron en Reino Unido otros brotes de meningitis causados por estreptococos que presentaban propiedades bioquímicas similares a las descritas por Jensen. Años más tarde, entre 1956 y 1963, de Moor caracterizó bioquímicamente y serológicamente estreptococos aislados a partir de infecciones septicémicas de cerdos (de Moor, 1963). Estos microorganismos presentaban diferencias con respecto al resto de especies conocidas incluidas en el género *Streptococcus*, y en consecuencia fueron clasificados en los nuevos grupos de R, S, RS y T, según el sistema de clasificación

de Lancefield, basado en la naturaleza antigénica de los hidratos de carbono de la pared celular. Posteriormente, Elliot (1966) sugirió que el grupo S de de Moor pertenecía al grupo D Lancefield. Finalmente, en el año 1987, mediante estudios de hibridación ADN-ADN se estableció *S. suis* como una nueva especie bacteriana. Los resultados de hibridación ADN-ADN mostraron que, independientemente de su grupo Lancefield, todas las cepas investigadas estaban muy relacionadas entre sí, presentando una similitud en su genoma mayor del 80% (Kilpper-Balz y Schleifer, 1987).

### 1.1.2 Encuadre taxonómico

En cuanto a la clasificación taxonómica, *S. suis* se encuadra en el filum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Streptococcaceae* y género *Streptococcus*. El género *Streptococcus*, género tipo de la familia *Streptococcaceae*, encuadra alrededor de 85 especies conocidas, entre ellas *S. suis*. Acorde con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Whiley y Hardie, 2009), el género *Streptococcus* se encuentra dividido en 8 grupos: grupo Piogénico o Piógeno, Mutans, Anginosus, Salivarius, Mitis, Bovis, Hyovaginalis y otro grupo que incluye 7 especies no asignadas a ningún grupo, entre las que se incluye *S. suis*.

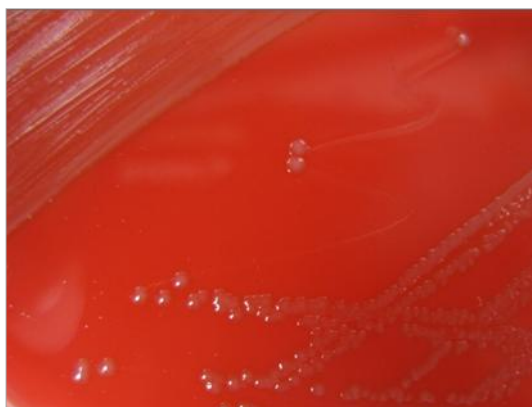
Esta especie fue clasificada en 35 serotipos diferentes, atendiendo a las diferencias en las propiedades antigénicas de la cápsula polisacáridica (Higgins y col., 1995). Sin embargo, en la actualidad se distinguen 33 serotipos (serotipos 1 a 31, 33 y 1/2). La comparación de las secuencias de los genes que codifican para el 16S ARNr y para la chaperonina 60 (*cpn60*) de las cepas de referencia de los 35 serotipos iniciales con las de otras especies de estreptococos demostró que los serotipos 32 y 34 pertenecían a la especie *Streptococcus orisratti* (Hill y col., 2005). Recientemente, los resultados obtenidos a partir de estudios filogenéticos basados en la secuenciación de los genes, *sodA* y *recN*, así como de estudios de hibridación ADN-ADN han sugerido que los serotipos 20, 22, 26 y 33 también deberían ser retirados de la especie *S. suis*. Así, estos estudios han señalado que las cepas de referencia de los serotipos 20, 22 y 26 constituyen un mismo grupo filogenético que

podría ser una nueva especie y por otra parte que la cepa de referencia correspondiente al serotipo 33 estaba más relacionada con *Streptococcus acidominimus* que con otros serotipos de *S. suis*, sugiriendo de este modo que debería ser otra nueva especie (Tien y col., 2013).

### 1.1.3 Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

*S. suis* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, inmóvil, de bajo contenido en G+C, que presenta una forma cocoide u ovoide y que se puede encontrar agrupada en pares o en cadenas cortas. Es incapaz de producir catalasa, lo que permite diferenciar los estreptococos fácilmente del género *Staphylococcus*. *S. suis* desarrolla colonias pequeñas (1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro), grises o transparentes y ligeramente mucoides (Figura 1). La bacteria es hemolítica, pudiendo variar el tipo de hemólisis en función del agar sangre utilizado para su cultivo y/o aislamiento; así, *S. suis* presenta  $\alpha$ -hemólisis cuando crece en sangre de cordero y  $\beta$ -hemólisis en sangre de caballo (Kilpper-Balz y Schleifer, 1987; Staats y col., 1997).

Respecto a sus propiedades metabólicas, *S. suis* fermenta con producción de ácido, la D-glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, salicina, la trehalosa y la inulina. Sin embargo, no fermenta la L-arabinosa, D-manitol, D-sorbitol, glicerol, melezitosa o D-ribosa, y presenta resultados variables en la fermentación de la rafinosa, melibiosa e hialuronidasa. Es capaz de hidrolizar la arginina, esculina, salicina, almidón y glucógeno, pero no el hipurato, y no produce acetoina. Asimismo, *S. suis* produce L-ornitina, descarboxilasa, N-acetilglucosaminidasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y leucina arilamidasa. La producción de  $\beta$ -galactosidasa es variable, pero no produce fosfatasa ácida ni fosfatasa alcalina. También se ha descrito que no crece en NaCl al 6,5%, lo cual permite diferenciar los estreptococos fácilmente del género *Enterococcus*. Los estreptococos pueden crecer en un intervalo de temperaturas entre 20 y 40°C, siendo 37°C la temperatura más adecuada para su cultivo (Hommeiz y col., 1986).



**Figura 1. Crecimiento de *S. suis* en medio de cultivo agar sangre de cordero.**

### **1.1.4 Ecología**

El hábitat natural de *S. suis* es el tracto respiratorio superior del cerdo, particularmente las tonsilas y cavidades nasales, donde puede permanecer acantonado sin que los animales presenten sintomatología (Arends y col., 1984; Clifton-Hadley y col., 1986; Luque y col., 1999). Estos animales que quedan como portadores son la principal fuente de infección para otros cerdos y juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad (Higgins y Gottschalk, 1990; Han y col., 2001). De forma ocasional, *S. suis* también ha sido aislado a partir de vagina y prepucio de animales sin manifestaciones clínicas (Robertson y Blackmore, 1989).

El cerdo es el principal reservorio de esta bacteria, sin embargo ha sido aislado de otras especies, tanto domésticas como silvestres (Hommeze y col., 1988; Devriese y col., 1990, 1992, 1993, 1994; Salasia y col., 1994; Baums y col., 2007), lo que sugiere que este microorganismo posee una amplia capacidad de colonización (Devriese y col., 1993).

*S. suis* es un microorganismo que presenta una gran resistencia en el medio ambiente. En el agua, puede sobrevivir 10 minutos a 60°C o durante dos horas a

50°C y en canales durante 6 semanas (Clifton-Hadley y col., 1986). A temperatura ambiente, puede sobrevivir en polvo aproximadamente 24 horas y hasta 8 días en heces (Clifton-Hadley y Enright, 1984). Además, *S. suis* parece ser fácilmente transmitido a través de fómites, siendo capaz de sobrevivir sobre botas o suelos de plástico, especialmente cuando estos se encuentran cubiertos de estiércol. La resistencia ambiental de este microorganismo puede facilitar la aparición de brotes en explotaciones que presenten unas condiciones higiénicas precarias. Sin embargo, *S. suis* es rápidamente inactivado por desinfectantes usados de forma común en laboratorios y granjas, exceptuando el alcohol al 70% (Dee y Corey, 1993).

## 1.2 Factores de virulencia

En la actualidad, todavía existe una cierta controversia respecto a la virulencia de *S. suis*, principalmente como resultado de los diferentes parámetros utilizados para definir si una cepa es o no virulenta, tales como: a) la condición clínica del animal del cual fueron aisladas (si las cepas proceden de animales clínicamente enfermos o sanos), b) la presencia de proteínas relacionadas con la virulencia y c) los resultados obtenidos tras la infección experimental en animales (modelo murino o porcino) (Beaudoin y col., 1992b; Galina y col., 1994; Vecht y col., 1997; Berthelot-Hérault y col., 2001; Berthelot-Hérault y col., 2005; Higgins y Gottschalk, 2006). Las experiencias en modelo porcino han dado lugar a resultados muy heterogéneos y a veces incluso contrarios, puesto que estos resultados pueden depender, entre otras consideraciones, del estado inmunológico de los animales, la ruta de infección, el tamaño del inóculo y la presencia de *S. suis* como habitante normal del tracto respiratorio (Gottschalk y col., 1999). Por otra parte, Vecht y col. (1997) consideraron que el modelo murino utilizado para la infección por *S. suis* es incompatible con el modelo en cerdo, puesto que la virulencia de *S. suis* sería específica de hospedador, mientras que Kataoka y col. (1991) sí consideraron que había una correspondencia entre ambos modelos animales. Además, existen discrepancias en la literatura en relación a la virulencia incluso tratándose de la misma cepa de *S. suis*, como es el caso de la cepa DH5 considerada por Galina y

col. (1994) y Okwumabua y col. (1995) como avirulenta para cerdos, mientras que Staats y col. (1998) la consideraron como altamente virulenta. Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre los factores de virulencia de *S. suis* se han realizado con cepas de serotipo 2, por lo que habría una falta de información sobre los posibles factores de virulencia en otros serotipos.

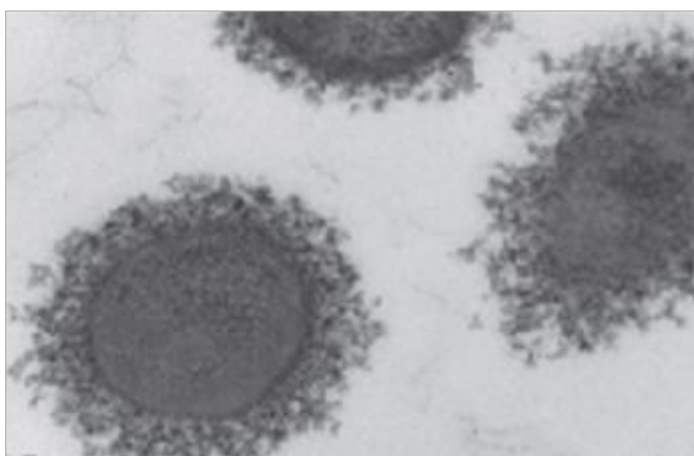
La cápsula polisacáridica (CPS, del inglés *capsular polysaccharide*) y varias proteínas, tales como la proteína liberada por la muramidasa (MRP, del inglés *muramidase-released protein*), el factor extracelular (EF, del inglés *extracellular protein factor*) o la suilisina (SLY, del inglés *sulysin*) han sido implicadas tradicionalmente en la virulencia de este microorganismo. Sin embargo, la presencia de dichas proteínas no justifica el carácter virulento de *S. suis*, puesto que se han descrito numerosas cepas virulentas asociadas a procesos infecciosos que no expresan dichas proteínas (Fittipaldi y col., 2009). En consecuencia, se ha sugerido la existencia de otros factores esenciales implicados en la virulencia. Durante los últimos años se han producido numerosos avances en la identificación y caracterización de posibles candidatos a factores de virulencia con el objetivo de entender la patogénesis de este patógeno y poder desarrollar vacunas realmente eficaces que prevengan las patologías asociadas a *S. suis*.

### 1.2.1 Factores clásicos de virulencia

#### Cápsula polisacáridica

*S. suis* es una bacteria encapsulada (Figura 2). El papel de la cápsula en relación a la virulencia consiste en proteger a la bacteria de la respuesta inmune del hospedador, evitando la activación del complemento y la fagocitosis de la bacteria por neutrófilos y macrófagos (Smith y col., 1999a; Gottschalk y Segura, 2000; Segura y col., 2004). Estas observaciones han sido confirmadas tanto *in vitro* como *in vivo* en estudios realizados con mutantes isogénicos no capsulados de cepas virulentas de serotipo 2.

Algunas investigaciones han propuesto que el grosor de la cápsula tiene una correlación con la virulencia. Así, Gottschalk y col. (1991b), indicaron que los aislados de *S. suis* serotipo 2 procedentes de animales enfermos poseían una cápsula más gruesa que los aislados procedentes de animales clínicamente sanos. Sin embargo, otros estudios no han mostrado correlación entre el espesor del material capsular y la virulencia (Higgins y Gottschalk, 2006).



**Figura 2.** Visualización mediante microscopía electrónica de transmisión de la cápsula de *S. suis* serotipo 2. Imagen cedida por Daniel Grenier.

Asimismo, se ha sugerido que la composición del material capsular, principalmente el ácido siálico, puede influir en la capacidad invasiva de las cepas. Se ha demostrado que el ácido siálico se encuentra implicado en la adhesión (sin fagocitosis) de *S. suis* a los monocitos, hecho que permitiría al patógeno viajar en el torrente sanguíneo asociado externamente a estas células fagocíticas, pudiendo atravesar la barrera hematoencefálica unido a ellas (Gottschalk y Segura, 2000). Además, este compuesto puede ser esencial para la síntesis de la cápsula, tal y como se deduce del estudio realizado con un mutante defectivo en *neuB* (gen esencial para la biosíntesis del ácido siálico) que resultó en un fenotipo de cápsula más delgada y de mayor susceptibilidad al pH (Feng y col., 2012).



Aunque algunas investigaciones, tal y como se ha indicado en párrafos anteriores, apoyan la hipótesis de que la presencia de cápsula influye de forma positiva en la virulencia de *S. suis*, también existen estudios que han indicado datos contrarios, sugiriendo que esta estructura podría obstaculizar la unión de las adhesinas de superficie a los receptores en las células. Así, Vanier y col. (2004) describieron que la expresión de la cápsula podría interferir en la adhesión de este microorganismo a las células endoteliales microvasculares del cerebro de origen porcino. Del mismo modo, Benga y col. (2004) y Lakkittjaroen y col. (2011) demostraron que los mutantes sin cápsula presentaban niveles más altos de adhesión e invasión a las células HEp-2 (línea celular de carcinoma epidermoide de laringe humano) y plaquetas porcinas y humanas en comparación con cepas capsuladas. Así, se ha planteado la hipótesis de que durante la infección *S. suis* podría disminuir la expresión de la cápsula para aumentar la adhesión a células epiteliales y, después de pasar la barrera epitelial y entrar en el torrente sanguíneo, se incrementaría la expresión de cápsula en respuesta a estímulos externos para la protección de la bacteria frente a la fagocitosis (Gottschalk y Segura, 2000).

### Proteína liberada por muramidasa

La proteína liberada por muramidasa es una proteína de peso molecular de 136 kDa asociada a la pared celular que es liberada durante el crecimiento bacteriano (Vecht y col., 1991). MRP es codificada por el gen *mrp* y es una proteína de superficie unida covalentemente a la pared mediante un motivo C-terminal “LPXTG” (leucina-prolina-X-treonina-glicina). Esta proteína posee diferentes variantes, de peso molecular superior e inferior: las proteínas MRP\* (> 136 kDa) y MRPs (<136 kDa) (Silva y col., 2006). Hasta el momento, no se ha esclarecido el papel que esta proteína desempeña en la patogénesis de *S. suis*. Algunos hallazgos indican que podría desempeñar un papel en la adherencia (Tan y col., 2008b). A este respecto, Smith y col. (1992) observaron que la secuencia del gen *mrp* posee una región que muestra similitud con la proteína de *Staphylococcus aureus* responsable

de la unión a la fibronectina humana; sin embargo, esta unión no ha sido confirmada en el caso de MRP.

La proteína MRP junto con la proteína EF, descrita en el siguiente apartado, fueron propuestas como marcadores de virulencia en base a estudios experimentales en los cuales se determinó que estas proteínas eran producidas por la mayoría de las cepas aisladas de cerdos enfermos, pero no por las procedentes de cerdos sanos (Vecht y col., 1991, 1992). Sin embargo, Smith y col. (1996), utilizando mutantes isogénicos han observado que la cepa defectiva puede ser tan virulenta como la salvaje. Además, estudios recientes muestran que no existe una estricta correlación entre la expresión de MRP y la virulencia; de hecho en Norteamérica un porcentaje elevado de cepas procedentes de casos clínicos no expresan dicha proteína (Fittipaldi y col., 2009, 2011; Gottschalk y col., 2013).

### **Factor extracelular**

Vecht y col. (1991) describieron una proteína que presentaba un peso molecular de 110 kDa y que sólo se detectaba en el sobrenadante de los cultivos de *S. suis*. Esta proteína, denominada como EF, está codificada por el gen *epf* y puede presentar diferentes variantes de mayor tamaño (EF\*) que difieren en la parte C-terminal en función del número de repeticiones de una secuencia de 76 aminoácidos. Según el número de repeticiones, han sido descritas hasta 5 variantes (Smith y col., 1993). Del mismo modo que MRP, se desconoce la función de la proteína que *epf* codifica, así como su papel en la virulencia de *S. suis*. Además, la ausencia de esta proteína no necesariamente implica la pérdida de virulencia; así numerosas cepas de serotipo 2 aisladas de casos de septicemia o meningitis (de origen porcino o humano) en América del Norte no expresan dicha proteína (Gottschalk y col., 1998; Chattelier y col., 1999).

### Suilisina

Jacobs y col. (1994) identificaron y caracterizaron una hemolisina de 54 kDa que recibió el nombre de suilisina (SLY). Otra hemolisina de 65 kDa fue descrita un año más tarde (Gottschalk y col., 1995). Estas dos proteínas resultaron ser la misma, variando la masa como resultado de los diferentes métodos de purificación. La suilisina es miembro de la familia de las proteínas tiol activadas y presenta una serie de características en común con esta familia de toxinas, como la pérdida de actividad en presencia de oxígeno, la reactivación bajo condiciones de reducción, la inhibición por la unión de colesterol y la formación de poros transmembrana (Jacobs y col., 1994; Gottschalk y col., 1995). El gen que codifica para la hemolisina, *shy*, ha sido secuenciado y presenta una similitud relativamente elevada con la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* (Segers y col., 1998).

El papel de la suilisina en la patogénesis todavía no ha sido elucidado pero se ha demostrado que es citotóxica para el epitelio (Norton y col., 1999), endotelio (Charland y col., 2000; Vanier y col., 2004, 2007) e inclusive para las células del sistema inmune (Lecours y col., 2011) por lo que desempeñaría un papel importante en la disrupción e invasión de la mucosa y la barrera hematoencefálica.

Además, se ha descrito que la proteína purificada induce la liberación de varias citoquinas pro-inflamatorias por las células endoteliales microvasculares del cerebro tanto porcino como humano (Vadeboncoeur y col., 2003; Vanier y col., 2004), por las células de la sangre periférica (Segura y col., 2006) y por macrófagos alveolares en el cerdo (Lun y col., 2003). Para demostrar el papel de SLY en la infección, han sido producidos mutantes defectivos y probados en modelos animales; no obstante, algunos datos son contradictorios. Así, Allen y col. (2001), generaron un mutante sin el gen *shy* que no resultó ser citotóxico para macrófagos; fue avirulento en el modelo experimental murino mientras que su virulencia se vio ligeramente atenuada en el modelo de infección porcino. Sin embargo, en el estudio realizado por Lun y col. (2003), la cepa mutante ocasionó enfermedad en un modelo de infección

porcino de modo similar a la cepa salvaje, con la presencia de signos clínicos y aislamiento de la bacteria a partir de diferentes tejidos.

De igual modo que ocurre con las proteínas MRP y EF, la proteína SLY está presente en la mayor parte de los aislados de serotipo 2 de Asia y Europa, sin embargo sólo está presente en un número limitado de aislados procedentes de América del Norte (Okwumabua y col., 1999; King y col., 2001; Gottschalk y col., 2013). Por tanto, la presencia de SLY no justificaría tampoco el carácter virulento de los aislados de *S. suis*.

## 1.2.2 Otros factores asociados a la virulencia

### Sortasa A

Como en muchas bacterias Gram positivas, *S. suis* posee un sortasa, denominada sortasa A, que ancla a la pared celular una serie de proteínas extracelulares que contienen un motivo LPXTG, como por ejemplo las proteínas MRP y SAO (antígeno de superficie *Sao*) (Osaki y col., 2003; Wang y col., 2009). En *S. suis*, la sortasa A se encuentra codificada por el gen *strA* (Osaki y col., 2003).

La relevancia de la sortasa A en la patogénesis de *S. suis* ha sido investigada mediante el estudio de mutantes defectivos en los modelos experimentales murino y porcino. Así por ejemplo, los resultados obtenidos por Vanier y col. (2008), revelaron que el mutante mostraba una capacidad reducida de adhesión e invasión a las células endoteliales microvasculares del cerebro comparado con la cepa salvaje en el modelo de infección murino, además de mostrar una menor adherencia a la fibronectina y al colágeno tipo I. Otro estudio realizado por Wang y col. (2009), llevado a cabo con un mutante isogénico de una cepa altamente virulenta de *S. suis* de serotipo 2, mostró que la supresión de *strA* atenuaba la virulencia de la cepa y se producía una reducción significativa de la adherencia.

## Inosina 5-monofosfato deshidrogenasa

La inosina 5-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), codificada por el gen *impdh*, cataliza la oxidación de la inosina-5'-monofosfato (IMP) dependiente de NAD a xantosina-5'-monofosfato (XMP), paso limitante en la biosíntesis de la guanina. El estudio realizado por Zhang y col. (2009b), con un mutante defectivo en este gen, mostró que la cepa mutante era menos competente que la cepa parental de serotipo 2 en la fermentación de carbohidratos, presentaba una virulencia más atenuada en el modelo de infección murino y era incapaz de causar la muerte en lechones. Otro estudio realizado recientemente mostró que el mutante defectivo había perdido la capacidad de utilizar manosa, hecho que estuvo relacionado con la disminución de la expresión de dos enzimas glicolíticas, la triosafosfato isomerasa y la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, reduciendo de esta manera la adhesión y la virulencia de la cepa mutante en un modelo de infección porcino (Zhou y col., 2014).

## Di-Peptidil-Peptidasa IV

La proteasa di-peptidil-peptidasa IV (DPP IV) (70 kDa), ha sido detectada tanto en el sobrenadante del cultivo de *S. suis* como en la pared celular de este microorganismo (Jobin y Grenier, 2003). Es una serina proteasa capaz de liberar dipéptidos Xaa-Prolina o Xaa-Alanina (donde Xaa representa cualquier aminoácido) desde el extremo N-terminal de péptidos y proteínas (Mentlein, 1999). Ge y col. (2009) demostraron que el mutante en el gen *dpp IV* atenuaba en gran medida la virulencia de una cepa altamente patógena de *S. suis* de serotipo 2, además de mostrar que la DPP IV puede interactuar con la fibronectina humana. Asimismo, se ha señalado que esta proteína podría estar implicada de manera significativa en la desregulación del proceso inflamatorio durante la meningitis (Jobin y col., 2005b).

## Ligasa transportadora de la D-alanina-D-alanil

El ácido lipoteicoico (LTA) se encuentra en muchas de las bacterias Gram positivas y es considerado como el equivalente del lipopolisacárido en las Gram negativas (Kengatharan y col., 1998). La D-alanilación requiere la actividad de cuatro productos génicos codificados por el operón *dlt*, responsable de la incorporación de residuos D-alanina en los ácidos lipoteicoicos (Neuhaus y Baddiley, 2003). La importancia de la D-alanilación del LTA en la virulencia de *S. suis* de serotipo 2 ha sido evaluada recientemente. Los resultados obtenidos por Fittipaldi y col. (2008b) revelaron que el mutante defectivo presentaba una virulencia atenuada tanto en el modelo de infección porcino como en el murino. Debido a la falta de residuos de D-alanina (que reducirían la carga negativa global de la pared), la cepa mutante mostró una menor adherencia e invasión de las células endoteliales microvasculares del cerebro en el cerdo, fue eliminada de una manera más eficiente por los neutrófilos y resultó ser más susceptible a la acción de los péptidos antimicrobianos catiónicos.

## Regulador de la respuesta *covR*

En el control de la virulencia de diversos microorganismos han sido implicados sistemas de transducción de señales de dos componentes (Dziejman y col., 1995). En general, un sistema de transducción de señales consiste en un sensor, que es una quinasa, y un efector, o regulador de la respuesta citoplasmática, que es generalmente una proteína de unión al ADN que modula la expresión de determinados genes. En *S. suis* de serotipo 2 han sido identificados al menos 15 sistemas de transducción de señales (Chen y col., 2007). Pan y col. (2009) identificaron un regulador de la expresión génica, el regulador de la respuesta *covR*, que realiza un control negativo de la virulencia de *S. suis*. La amplificación del gen mediante PCR mostró que el locus *covR* se encuentra presente en todos los serotipos de *S. suis* a excepción del serotipo 20 (Pan y col., 2009). Estos autores demostraron que el mutante defectivo mostraba *in vitro* un incremento de la adherencia a las células epiteliales HEP-2 y endoteliales HUVEC (células

endoteliales de la vena del cordón umbilical humano) humanas y una mayor resistencia a la fagocitosis. Asimismo, observaron una mejora de la habilidad del mutante para colonizar diversos tejidos susceptibles y un incremento de la letalidad tras realizar una infección experimental en cerdos.

### Antígeno de superficie SAO

La proteína SAO (*surface antigen one*) fue descrita por primera vez por Li y col. (2006). SAO es una proteína inmunogénica que se expresa en la superficie bacteriana y confiere protección a los animales inmunizados (Li y col., 2006; Li y col., 2007). El anclaje de dicha proteína de superficie al peptidoglicano está mediado por *srlA* (Li y col., 2006). Se han detectado tres variantes alélicas del gen, *sao-S*, *sao-M* y *sao-L*, basadas en las diferentes longitudes de la secuencia de nucleótidos (aproximadamente 1,5, 1,7, y 2,0 Kb, respectivamente), siendo la variante *sao-M*, la más frecuentemente detectada (Feng y col., 2007). Esta proteína ha sido evaluada como candidato vacunal (Li y col., 2007; Hsueh y col., 2013), sin embargo el papel de SAO en la virulencia de *S. suis* no ha sido esclarecido por el momento. En un reciente estudio (Roy y col., 2014), los resultados *in vivo* obtenidos con el mutante isogénico  $\Delta_{sao}$ , revelaron que dicho mutante y la cepa salvaje no presentaban diferencias significativas en los niveles de adhesión/invasión de las células epiteliales respiratorias porcinas y la resistencia a la fagocitosis por los macrófagos fue similar. Además, en el modelo de infección murino, los grupos infectados con la cepa salvaje y el mutante presentaron signos clínicos de enfermedad. Por tanto, a pesar de que no se puede descartar la existencia de un cierto papel en la virulencia, la proteína SAO no parece desempeñar un papel crítico en la virulencia de *S. suis*.

### Enolasa

La enolasa es una enzima citoplasmática que interviene en la glucólisis y gluconeogénesis, catalizando la conversión del 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato. Recientemente, Esgleas y col. (2008) demostraron que además se encuentra presente en la superficie celular de *S. suis*. Esta proteína es expresada,

además de por cepas de serotipo 2, por cepas pertenecientes al resto de serotipos (Esgleas y col., 2008). La enolasa (codificada por el gen *eno*) es capaz de unirse al plasminógeno y la fibronectina y en consecuencia podría jugar un papel importante en el proceso de la adhesión e invasión de las células endoteliales (Esgleas y col., 2008; Feng y col., 2009a; Zhang y col., 2009a). Así, los experimentos de inhibición realizados con anticuerpos anti-SsEno mostraron que la proteína SsEno es importante para la adhesión y la invasión de las células endoteliales microvasculares del cerebro porcino, lo que sugiere que esta proteína contribuiría de manera importante en la patogénesis de la meningitis (Esgleas y col., 2009).

### Otros factores de virulencia

Además de los mencionados anteriormente, que han sido considerados importantes o implicados en la patogénesis de la infección causada por *S. suis*, han sido propuestos otros factores relacionados con la virulencia. Así, se han descrito varias adhesinas relacionadas con la adherencia e invasión de la mucosa epitelial, tales como la amilopululanasa (Ferrando y col., 2010), las enzimas glicolíticas 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Tan y col., 2008a) o la glutamina sintetasa (Si y col., 2009). La microscopía electrónica también ha mostrado la presencia de otras estructuras relacionadas con la adhesión, como los pilis implicados en la unión a las células endoteliales microvasculares (Takamatsu y col., 2009; Fittipaldi y col., 2010). Otras enzimas han sido relacionadas con la adhesión a los componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo la proteína de unión a fibronectina-fibrinógeno (de Greeff y col., 2002b), la hialuronato liasa que puede degradar el ácido hialurónico (Allen y col., 2004) o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que además de mostrar capacidades adhesivas, es una enzima implicada en el metabolismo (Brassard y col., 2004; Jobin y col., 2004; Wang y Lu, 2007). Otras proteínas implicadas en el metabolismo básico de la bacteria serían la glutamato deshidrogenasa (Okwumabua y col., 2001) o la fosfoglicerato mutasa (Okwumabua y Chinnapapakkagari, 2005). Asimismo, han sido descritas varias proteasas,



incluyendo la endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa D (Wilson y col., 2007), la fosfolipasa C (Jobin y col., 2005a) y una DNAsa (de Buhr y col., 2014).

Además existen otros factores que podrían participar en la virulencia de *S. suis*. Así, la peptidoglicano GlcNAc deacetilasa cataliza la N-deacetilación del peptidoglicano mejorando su resistencia a la lisozima y supervivencia en sangre (Fittipaldi y col., 2008a) o la proteasa IgA1 que limita la cantidad funcional de dicha inmunoglobulina importante para la defensa del hospedador (Zhang y col., 2010; Zhang y col., 2011). Del mismo modo, existen enzimas de actividad citotóxica, como la superóxido dismutasa (Langford y col., 1991) que podría estar implicada en la supervivencia intracelular, o el factor de opacidad sérico (Baums y col., 2006). También se ha descrito una isla de patogenicidad de 89Kb (denominada 89K) asociada con cepas epidémicas de serotipo 2 aisladas de los brotes notificados en China en 1998 y 2005 (Chen y col., 2007). Incluido en esta isla de patogenicidad se encuentra el sistema de regulación *SalK-SalR*, que ha sido descrito como indispensable para la actividad completa de dicha isla de patogenicidad (Chen y col., 2007; Li y col., 2008). Otro sistema de regulación descrito sería *RevSC21* que influye en la expresión de ciertos factores asociados a la virulencia como los genes *mrp*, *epf*, *sly* y *gapdh* (el cual codifica para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), entre otros (Wu y col., 2009).

En una reciente revisión realizada por Fittipaldi y col. (2012) se recogen los factores anteriormente mencionados y otros también implicados en la patogénesis de la infección. Muchos de estos factores se encuentran todavía en fase de estudio; en algunos de ellos, la función se encuentra aún por determinar y en otros no se ha descrito un mutante isogénico o ha sido demostrada su presencia sólo en cepas virulentas, por lo que su potencial patogénico no se ha podido comprobar hasta el momento. Algunos de los factores más destacados se muestran en la Tabla 1 en la que se ha incluido sus funciones.

Tabla 1. Factores asociados a la virulencia en *S. suis*.

Factor/ gen	Función (propuesta o verificada)	Referencia
<b>Cápsula (<i>cps</i>)</b>	Protección frente al sistema inmune	Smith y col., 1999a; Gottschalk y Segura., 2000; Segura y col., 2004).
<b>Muramidasa (<i>mvp</i>)</b>	Desconocida.	Vecht y col., 1991; Smith y col., 1996.
<b>Factor extracelular (<i>epf</i>)</b>	Desconocida.	Vecht y col., 1991; Smith y col., 1996
<b>Suilisina (<i>sly</i>)</b>	Hemolisina.	Jacobs y col., 1994; Gottschalk y col., 1995; Lun y col., 2003.
<b>Enolasa (<i>eno</i>)</b>	Adhesión (unión a fibronectina y plasminógeno).	Esgleas y col., 2008.
<b>Sortasa A (<i>strA</i>)</b>	Unión de proteínas a la pared celular.	Osaki y col., 2003; Wang y col., 2009.
<b>Inosina 5-monofosfato deshidrogenasa (<i>impdh</i>)</b>	Biosíntesis de la guanina.	Zhang y col., 2009b.
<b>Dipeptidil peptidasa IV (<i>dppIV</i>)</b>	Adhesión (unión a fibronectina).	Jobin y Grenier, 2003; Ge y col., 2009.
<b>Ligasa D-alanina-D-alanil (<i>dltA</i>)</b>	Alanilación del ácido lipoteicoico.	Fittipaldi y col., 2008b.
<b>Regulador de la respuesta <i>CovR</i> ( <i>covR</i>)</b>	Represor global de transducción de señales.	Pan y col., 2009.
<b>Antígeno de superficie <i>uno</i> (<i>sao</i>)</b>	Inmunógena.	Li y col., 2006.
<b>Proteína de unión a fibronectina-fibrinógeno (<i>fbps</i>)</b>	Adhesión (unión a fibronectina).	de Greeff y col., 2002b.
<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>gapdh</i>)</b>	Adhesión a plasminógeno. Metabolismo: glicólisis y la gluconeogénesis.	Brassard y col., 2004; Jobin y col., 2004; Wang y Lu, 2007.
<b>Glutamato deshidrogenasa (<i>gdh</i>)</b>	Metabolismo.	Okwumabua y col., 2001.
<b>Fosfoglicerato mutasa (<i>pgm</i>)</b>	Metabolismo.	Okwumabua y Chinnapakkagari, 2005.
<b>Endo-<math>\beta</math>-N acetilglucosaminidasa D (<i>endo D</i>)</b>	Degradación de oligosacáridos.	Wilson y col., 2007.
<b>DNasa (<i>ssnA</i>)</b>	Disrupción de red formada por los neutrófilos NETs	De Buhr y col., 2014.

Tabla 1. Continuación.

Factor/ gen	Función (propuesta o verificada)	Referencia
<b>Fosfolipasa C (<i>plc</i>)</b>	Modulación de la producción de ácido araquidónico.	Jobin y col., 2005a.
<b>Hialuronato liasa (<i>hyl</i>)</b>	Degradación del ácido hialurónico.	Allen y col., 2004.
<b>PeptidoglicanoGlcNAc deacetilasa (<i>pgdA</i>)</b>	N-deacetilación del peptidoglicano. Mejora la resistencia a la lisozima.	Fittipaldi y col., 2008a.
<b>Superóxido dismutasa (<i>sodA</i>)</b>	Resistencia a la toxicidad.	Langford y col., 1991.
<b>Factor de opacidad sérico (<i>ofs</i>)</b>	Opacificación del suero.	Baums y col., 2006.
<b>Isla de patogenicidad 89k (PAI89K)</b>	Acogida de genes que codifican factores de virulencia.	Chen y col., 2007.
<b>Regulador de la respuesta <i>SalK-SalR</i> (<i>SalK-SalR</i>)</b>	Sistema de transducción de señales.	Chen y col., 2007; Li y col., 2008.
<b>Regulador de la respuesta <i>RevSC21</i> (<i>RevSC21</i>)</b>	Sistema de transducción de señales.	Wu y col., 2009.
<b>Regulador de la respuesta <i>CiaH-CiaR</i> (<i>CiaH-CiaR</i>)</b>	Sistema de transducción de señales.	Li y col., 2011.
<b>Regulador de la respuesta <i>LuxS</i> (<i>LuxS</i>)</b>	Regulación de transcripción de genes.	Wang y col., 2011.
<b>Regulador de la respuesta <i>RevS</i> (<i>RevS</i>)</b>	Regulador de transducción de señales.	de Greeff y col., 2002a.
<b>Regulador de la respuesta <i>Rgg</i> (<i>Rgg</i>)</b>	Regulación de la transcripción.	Zheng y col., 2011.
<b>Amilopululanasa (<i>amyA</i>)</b>	Adhesión.	Ferrando y col., 2010.
<b>6-fosfogluconato deshidrogenasa (<i>6pgd</i>)</b>	Adhesión.	Tan y col., 2008a.
<b>Glutamina sintetasa (<i>glnA</i>)</b>	Adhesión.	Si y col., 2009.
<b>Proteasa IgA1</b>	Disminuye la cantidad funcional de IgA1.	Zhang y col., 2010, 2011.
<b>Subtilisina (<i>SspA</i>)</b>	Degradación de la IL-8.	Bonifait y col., 2011.

### 1.3 Métodos de caracterización de *S. suis*

La serotipificación es un método basado en la determinación de los antígenos polisacáridos de la cápsula que permite la clasificación de *S. suis*. En la actualidad este microorganismo es clasificado en 33 serotipos diferentes (serotipos 1 a 31, 33 y 1/2) (Higgins y col., 1995). Tal y como se ha mencionado anteriormente (ver apartado 1.1.2), los serotipos 32 y 34 han sido reclasificados como pertenecientes a la especie *S. orisratti* (Hill y col., 2005). La serotipificación puede realizarse utilizando alguna de las siguientes técnicas: la reacción capsular, la precipitación capilar o el test de coaglutinación; siendo la prueba de coaglutinación en placa el método más ampliamente utilizado (Clifton-Hadley y Alexander, 1991; Gottschalk y col., 1993). La técnica PCR ha sido en los últimos años la técnica de elección no sólo para la identificación de la especie *S. suis* (Okwumabua y col., 2003), sino también para la identificación de los serotipos más frecuentes (Smith y col., 1999b; Wisselink y col., 2002; Silva y col., 2006) o inclusive de todos los serotipos descritos (Liu y col., 2013).

Con el uso de la coaglutinación en placa han sido observadas varias reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos, lo que indica que algunos determinantes antigénicos capsulares son compartidos por diferentes serotipos. Este sería el caso del serotipo 1/2 que presenta reacción cruzada con los antisueros de los serotipos 1 y 2 (Perch y col., 1983). Asimismo, otras reacciones cruzadas han sido descritas entre los serotipos 6 y 16 o entre los serotipos 2 y 22 (Gottschalk y col., 1989; Gottschalk y col., 1991a; Higgins y col., 1995). Sin embargo, estas reacciones cruzadas pueden evitarse mediante la absorción del antisuero o mediante el uso simultáneo de varias de las técnicas descritas anteriormente (Gottschalk y col., 1989; Higgins y col., 1995).

Por otra parte, ciertos estudios han indicado la existencia de cepas que no reaccionan frente a ninguno de los antisueros (Marois y col., 2007; Wei y col., 2009), por lo que serían consideradas como no tipables. Estas cepas pueden pertenecer a un nuevo, pero aún no descrito serotipo, o bien pueden ser cepas

desprovistas de la cápsula y por tanto imposibles de serotipificar (Gottschalk y col., 2013). Se ha comprobado que aquellas cepas no tipables de *S. suis* que poseen una elevada hidrofobicidad (fácilmente medida de acuerdo con el protocolo propuesto por Rosenberg, en 1980, mediante la absorción del hexadecano) son probablemente cepas que han perdido la cápsula o se encuentran débilmente encapsuladas (Bonifait y col., 2010; Gottschalk y col., 2013).

La mayoría de los autores señalan que la serotipificación proporciona una caracterización limitada de los aislados, y presenta un escaso valor epidemiológico, puesto que cepas de *S. suis* pertenecientes a un mismo serotipo muestran una amplia diversidad genética (Mogollon y col., 1990; Okwumabua y col., 1995; Staats y col., 1998; Rasmussen y col., 1999; King y col., 2002; Vela y col., 2003). Por esta razón, para la tipificación de aislados de *S. suis* se han utilizado otros sistemas diferentes de tipificación fenotípicos, así como genotípicos.

Para la caracterización fenotípica de *S. suis* podrían utilizarse métodos basados en el estudio de distintas características fisiológicas o bioquímicas del microorganismo. Así por ejemplo, se ha utilizado la determinación de las proteínas asociadas a la virulencia MRP, EF y SLY (Luque y col., 1999; Berthelot-Hérault y col., 2000; Wisselink y col. 2000; Tarradas y col., 2001a; Rehm y col., 2007; Blume y col., 2009; Fittipaldi y col., 2009) o la electroforesis de enzimas multiloculares (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis*, MLEE) que detecta diferencias en la movilidad electroforética de enzimas metabólicas hidrosolubles (Hampson y col., 1993). Sin embargo, el extraordinario avance de la biología molecular ha permitido desarrollar nuevos métodos de caracterización de tipo genético (basados en el estudio del ADN), siendo cada vez más frecuente la utilización de estos métodos para la caracterización de los aislados debido principalmente a que presentan un mayor poder discriminatorio que las técnicas de tipificación basadas en características fenotípicas (Mogollon y col., 1990; King y col., 2002; Vela y col., 2003). Los estudios de caracterización genética han incrementado el conocimiento sobre la epidemiología de *S. suis*, permitiendo determinar la diversidad y evolución de las cepas tanto a lo largo del tiempo como a nivel geográfico (King y col., 2002; Marois

y col., 2007; Wei y col., 2009; Schultsz y col., 2012; Gottschalk y col., 2013) o identificar las cepas implicadas en brotes epidémicos (Ye y col., 2006; Wang y col., 2008; Li y col., 2010). Han sido desarrolladas numerosas técnicas para la caracterización genética de *S. suis*, como el ribotipado (Staats y col., 1998; Rasmussen y col., 1999; Tarradas y col., 2001b) el análisis de los patrones de restricción (*Restriction Endonuclease Analysis*, REA) (Mogollon y col., 1990; Beaudoin y col., 1992a; Amass y col., 1997), el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (Marois y col., 2006), el estudio de la amplificación de fragmentos de restricción (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (Neis y col., 2007; Rhem y col., 2007), PCR con iniciadores de secuencia arbitrarios (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (Chatellier y col., 1999; Martínez y col., 2002; Cloutier y col., 2003), la electroforesis de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (Allgaier y col., 2001; Berthelot-Hérault y col., 2002; Vela y col., 2003; Blume y col., 2009; Kerdsin y col., 2009; Luque y col., 2010; Hoa y col., 2011), la tipificación de secuencias multiloculares (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) (King y col., 2002; Chang y col., 2006; Rehm y col., 2007; Blume y col., 2009; Takamatsu y col., 2009; Schultsz y col., 2012; Zhu y col., 2013) y la reciente técnica descrita que analiza múltiples locus que contienen un número variable de repeticiones en tándem (*Multiple Locus Variable Tandem Repeat Number Analysis*, MLVA) (Li y col., 2010).

En la actualidad, las técnicas PFGE y MLST son dos de las más utilizadas en la caracterización de *S. suis*. La técnica PFGE está basada en el análisis de patrones de bandas generados después de la digestión enzimática con enzimas de baja frecuencia de corte de todo el genoma bacteriano tras someterlo a una electroforesis multidireccional. Dicha técnica tiene la ventaja, respecto a otras técnicas de restricción enzimática como RFLP o AFLP, de que explora todo el cromosoma bacteriano detectando la variabilidad existente en los lugares de restricción de la enzima (Berthelot-Hérault y col., 2002; Vela y col., 2003). La técnica PFGE presenta un elevado poder discriminatorio (Vela y col., 2003; Tian y col., 2004; Chang y col., 2006; Ye y col., 2006; Luey y col., 2007; Marois y col., 2007; Sabat y col., 2013) y es muy útil en estudios locales para la caracterización de

aislados procedentes de brotes (Ye y col., 2006; Sabat y col., 2013). Sin embargo, es considerada una técnica laboriosa y de elevada inversión económica en estudios en los que se analiza un elevado número de aislados. Además, el análisis de los patrones de restricción conlleva una interpretación subjetiva; en consecuencia, la comparación entre diferentes laboratorios resulta complicada, además de no existir ninguna base de datos disponible para *S. suis* capaz de permitir la comparación de resultados (Vázquez y Berrón, 2004; Ye y col., 2006; Sabat y col., 2013).

Por el contrario, la técnica MLST es un método estandarizado para la caracterización de *S. suis* que dispone de una base de datos internacional (<http://ssuis.mlst.net>) y que permite la fácil comparación de los resultados entre diferentes laboratorios. Esta técnica detecta las variaciones de nucleótidos en la secuencia de una serie de genes conservados (*housekeeping genes*) tras su secuenciación. Ello permite la identificación de grupos de microorganismos con idéntico genotipo (clones) o altamente relacionados (líneas clonales), lo cual permite a su vez realizar comparaciones entre aislados y establecer la evolución genética de clones bacterianos a través de una base de datos *on-line* (Urwin y Maiden, 2003; Vázquez y Berrón, 2004; Aanensen y Spratt, 2005; Turner y Feil, 2007). King y col. (2002) pusieron a punto la técnica MLST para la caracterización de *S. suis*, planteando el estudio de siete genes *housekeeping*: *5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (aroA)*, *60 KDa chaperonin (cpn60)*, *peroxide resistance (dpr)*, *glucose kinase (gki)*, *DNA mismatch repair protein (mutS)*, *homologous recombination factor (recA)* y *aspartokinase (thrA)*. La secuenciación parcial de estos genes es utilizada para determinar perfiles alélicos (siendo cada perfil alélico asignado a un *sequence typing* o ST) que son asociados mediante el algoritmo eBURST (<http://ssuis.mlst.net>) a diferentes complejos clonales (CC) según el número de locus en común (Feil y col., 2004). En la actualidad se encuentran descritos más de 500 ST diferentes para *S. suis* (Figura 3). Aunque tiene un menor poder de discriminación que PFGE (Blume y col., 2009; Kerdsin y col., 2009; Li y col., 2010; Fittipaldi y col., 2011), la objetividad y la disponibilidad de una base de datos *on-line* ha contribuido a su rápida expansión como técnica fiable para la caracterización molecular de *S. suis* (Ye y col., 2006; Fittipaldi y col., 2011; Hoa y col., 2011; Schultsz y col., 2012; Wang y col., 2013).

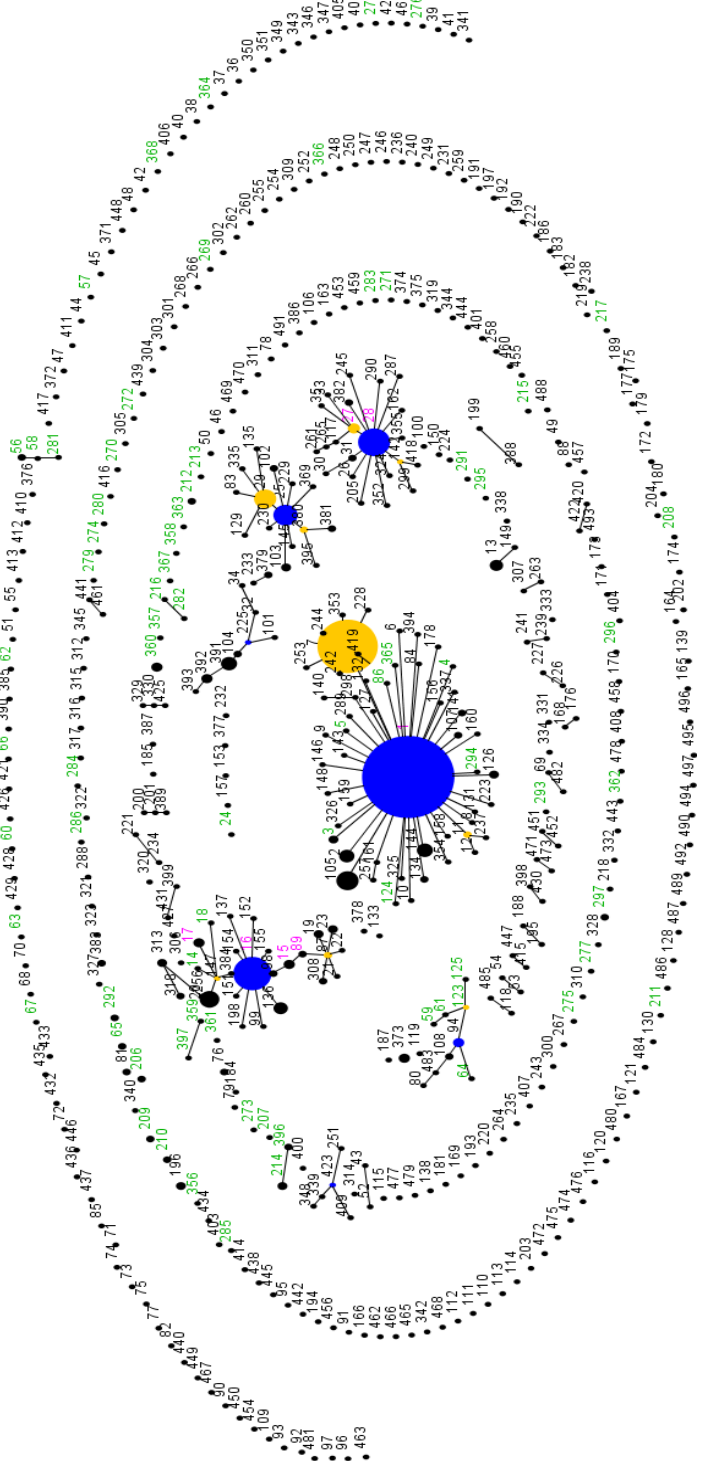


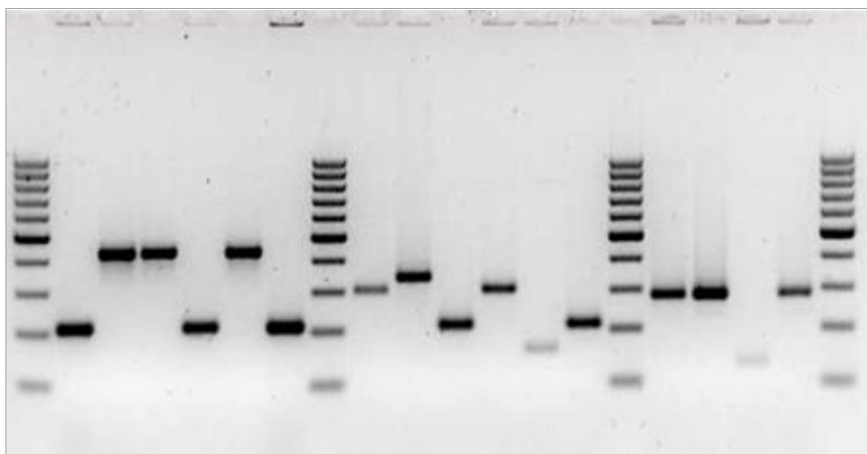
Figura 3. Análisis eBurst de todos los aislados incluidos en la base de datos de MLST de *S. suis* (<http://ssuis.mlst.net>, 2014). Los ST color rosa se corresponden con ST descritos en España y en otros países del mundo y los de color verde son exclusivos de nuestro país. Los CC fundadores se indican con puntos azules, mientras que los fundadores secundarios se indican con puntos amarillos.



A pesar de que MLST es una técnica relativamente sencilla de llevar a cabo, sin embargo la secuenciación conlleva un cierto coste económico que encarece el proceso. Por otra parte, MLST tiene el inconveniente de no ser una herramienta útil para realizar estudios epidemiológicos locales (Gilbert y col. 2006).

Recientemente se ha desarrollado y validado una nueva técnica molecular para la caracterización de aislados, denominada MLVA, basada en el análisis de varios locus que contienen un número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number Tandem Repeat*, VNTR). Estos VNTR presentan un gran índice de variabilidad genética y presentan utilidad como herramientas para la tipificación molecular de los microorganismos. Algunas regiones de ADN repetidas parecen estar vinculadas con mecanismos de patogenicidad o pueden actuar como reguladores génicos, modulando la actividad transcripcional de los genes mediante la pérdida o ganancia de repeticiones en las regiones promotoras (van Ham y col., 1993; Moxon y col., 1994). Dicha técnica ha sido utilizada satisfactoriamente en la tipificación genética de distintos patógenos bacterianos, incluido *S. suis* (Onteniente y col., 2003; Pourcel y col. 2004; Sawires y col., 2005; Witonski y col. 2006; Moser y col., 2009; Li y col., 2010; Haguenoer y col., 2011).

La técnica MLVA tiene la ventaja de ser una técnica fácil de realizar, rápida, fiable y permite la comparación de resultados entre laboratorios. Además, posibilita visualizar el polimorfismo en el número de unidades repetidas mediante un análisis sencillo por electroforesis (Figura 4), siendo el número de repeticiones calculado en base al tamaño de las secuencias amplificadas por PCR (Gilbert y col., 2006; Moser y col., 2009; Haguenoer y col., 2011; Sabat y col., 2013). Dada su alta reproducibilidad y alto rendimiento, MLVA representa un atractivo método de caracterización. Por otra parte, una vez que la técnica se encuentra diseñada y puesta a punto en un determinado microorganismo, resulta una técnica económica y ha sido propuesta como técnica de rutina en las investigaciones epidemiológicas de ciertos microorganismos (Gilbert y col., 2006; Elberse y col., 2011; Haguenoer y col., 2011; Tien y col., 2012; Chenal-Francisque y col., 2013).



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa en el cual se representa la amplificación de los distintos alelos para tres VNTR designados TR1, TR2 y TR3, según Li y col. (2010). Carriles 1, 8, 15 y 20: marcador de peso molecular, 100 bp; carriles 2-7: alelos correspondientes a TR1; carriles 9-14: alelos correspondientes a TR2; carriles 16-19: alelos correspondientes a TR3.

MLVA ha sido considerada como una técnica que presenta un mayor poder discriminatorio que MLST (Lindstedt y col., 2008; Li y col., 2010; van Cuyck y col., 2012), no obstante, los resultados no serían concluyentes comparada con la técnica PFGE. Así, según la especie bacteriana tipificada, algunos autores señalan el mayor poder discriminatorio de PFGE (Advani y col., 2009; Chenal-Francisque y col., 2013; Maâtallah y col., 2013), mientras que otros estudios, incluido el realizado para la caracterización de *S. suis*, señalan que la técnica MLVA posee una discriminación mayor (Liang y col., 2007; Killgore y col., 2008; Li y col., 2010; Sihvonen y col., 2011; Tien y col., 2012; Hu y col., 2013).

## 2. Infección por *S. suis* en animales

### 2.1 Infección por *S. suis* en el cerdo

#### 2.1.1 Sector porcino español

El sector porcino representa una actividad ganadera de gran importancia económica y productiva en nuestro país. Según los datos Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, el sector porcino representa el 12,4% de la producción final agraria y el 34,2 % de la producción final ganadera, siendo el sector más importante de la ganadería española. En el año 2013, el censo ascendió a 25.494.715 de animales, concentrándose fundamentalmente en tres comunidades autónomas, Cataluña, Aragón y Castilla y León, que representan más del 60% de la cabaña de porcino en España. Dentro del ámbito europeo, España es el segundo país con mayor censo de ganado porcino y con mayor producción de carne de cerdo de la Unión Europea. A nivel mundial, la Unión Europea es el segundo productor de carne de porcino, ocupando España el cuarto lugar como potencia productora (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; <http://www.magrama.gob.es>).

En la actualidad, en España existen dos tipos de producciones claramente diferenciadas: la porcicultura de carácter intensivo, que engloba alrededor del 90% del total, y la extensiva o semiextensiva, representada mayoritariamente por el cerdo ibérico. La porcicultura intensiva está representada principalmente por animales altamente productivos procedentes de líneas genéticas seleccionadas. Los animales son cebados a base de pienso y se encuentran confinados en naves de producción. La tendencia actual es hacia una producción intensiva en ciclo cerrado donde las diferentes fases de producción se localizan en un mismo emplazamiento. Por otro lado, la producción extensiva o semiextensiva está ligada principalmente al cerdo ibérico (Figura 5), cuyos productos son considerados de una mayor calidad y de

precio más elevado, aunque también es habitual el manejo intensivo del cerdo ibérico. Así pues, existen tres tipos de producción en el cerdo ibérico dependiendo del sistema de explotación y alimentación: a) la producción extensiva en la cual los cerdos ibéricos (considerados de montanera) se encuentran pastando en la dehesa, donde se alimentan principalmente de bellota y hierba (Figura 5), b) la producción semiextensiva, en la que aunque hayan podido aprovechar recursos de la dehesa o del campo, los cerdos han sido alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, y cuyo manejo se realiza en explotaciones extensivas o intensivas al aire libre y, c) la producción intensiva en la que los animales se ceban solamente con pienso y estabulados en naves (<http://www.magrama.gob.es>).



**Figura 5. Cerdo ibérico en montanera. Sistema de explotación extensivo. Imagen cedida por Emilio Santos (Finca de Canillas de Torneros).**

Las diferentes condiciones que existen en cada tipo de explotación pueden influir en la aparición de ciertos microorganismos. Así, el confinamiento de un gran número de animales, la falta de ventilación, el exceso de humedad, el movimiento y la mezcla de animales, entre otros muchos factores, pueden favorecer la aparición

de la enfermedad por *S. suis* en las explotaciones de tipo intensivo (Staats y col., 1997). Por el contrario, en la producción de tipo extensiva o semiextensiva el cerdo ibérico se encuentra perfectamente adaptado al ecosistema de la dehesa, no presentándose los factores estresantes anteriores; sin embargo, el contacto de estos animales con el medioambiente u otras especies animales (tanto domésticas como salvajes que pueden ser reservorios de otros agentes infecciosos) podría influir en la epidemiología de esta enfermedad, como se ha indicado en otras patologías como la tuberculosis (Parra y col., 2005).

### 2.1.2 Epidemiología

Las infecciones producidas por *S. suis* han constituido uno de los problemas más importantes en la industria porcina en todo el mundo (Gottschalk y col., 2010). Se han descrito infecciones en muchos de los países europeos, en el continente americano (Estados Unidos, Canadá, México, Brasil), asiático (China, Tailandia, Vietnam y Japón), Australia y Nueva Zelanda (Hampson y col., 1993; Staats y col., 1997; Aarestrup y col., 1998a; Wisselink y col., 2000; Wei y col., 2009; Hoa y col., 2011; Gottschalk y col., 2013).

La morbilidad puede variar de un 1% hasta un 50%, a pesar de que raramente supera el 5% (Windsor y col., 1977; Guise y col., 1986). Los altos porcentajes de infección están principalmente asociados con la higiene deficiente de la explotación o cuando el proceso es concomitante con otra enfermedad infecciosa. En ausencia de tratamiento, los índices de mortalidad pueden llegar a alcanzar hasta un 20% (Cloutier y col., 2003). *S. suis* puede afectar a todas las fases de producción aunque los lechones son los más susceptibles, disminuyendo tras el destete (Lamont y col., 1980). La mayor incidencia se puede observar cuando los lechones presentan menos de 16 semanas (Reams y col., 1993, 1996).

El hábitat natural de *S. suis* es el tracto respiratorio superior, siendo las tonsilas y la cavidad nasal de los animales portadores el principal lugar de acantonamiento (Clifton-Hadley, 1984; Tarradas y col., 1994). La transmisión se ha demostrado que

puede ser tanto vertical como horizontal. *S. suis* se transmite habitualmente de forma oral o nasal a través de aerosoles o por contacto directo, o a través de lesiones en la piel. Los lechones recién nacidos pueden infectarse a través de las vías respiratorias, debido al contacto con la cerda o sus heces (Berthelot-Hérault y col., 2001). Los lechones nacidos de cerdas con infecciones uterinas y/o vaginales pueden nacer infectados o bien infectarse al nacimiento (Robertson y Blackmore, 1989). De este modo, pueden aparecer brotes dentro de una misma camada cuando disminuyen los anticuerpos maternos en lechones infectados por cerdas portadoras y producirse la infección de otras camadas con las que se mezclan en el destete (Robertson y Blackmore, 1989; Cloutier y col., 2003).

Los animales portadores juegan un papel muy importante en la epidemiología de este patógeno. Se ha demostrado que la introducción de animales portadores en explotaciones de animales susceptibles puede dar lugar a la aparición de procesos clínicos (Clifton-Hadley, 1985; Berthelot-Hérault y col., 2001). Los estudios realizados tanto en animales de matadero como en explotaciones porcinas, revelan porcentajes variables de animales portadores, llegando a alcanzar porcentajes del 100% (Arends y col., 1984; Brisebois y col., 1990; Marois y col., 2007; Hoa y col., 2011). Los animales portadores pueden desarrollar la enfermedad, permanecer como tales sin mostrar síntomas clínicos (Clifton-Hadley, 1984) o incluso se ha señalado que *S. suis* puede persistir en tonsilas después de un tratamiento con pienso medicado con penicilina (Clifton-Hadley, 1984).

La existencia de ciertos factores predisponentes puede desencadenar la aparición de enfermedad. Así, se ha demostrado que la existencia de microorganismos concomitantes (como *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* o las infecciones por el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino o de la enfermedad de Aujeszky) aumentan la susceptibilidad de los animales a la infección por *S. suis* (Iglesias y col., 1992; Thanawongnuwech y col., 2000; Roberts y Almond, 2003). El hacinamiento, la mala ventilación, cambios bruscos de temperatura, el movimiento de animales o la vacunación son factores que predisponen a los cerdos a la infección por *S. suis* (Staats y col., 1997). Además,

se ha demostrado que la existencia de vectores, como moscas (Enright y col., 1987), así como las heces, polvo, agua o pienso también desarrollan un papel importante como fuentes de contaminación favoreciendo la transmisión de este microorganismo en la granja (Dee y Corey, 1993).

### 2.1.3 Sintomatología

Las formas clínicas producidas por *S. suis* en la especie porcina pueden ser muy variables. *S. suis* puede causar meningitis, meningoencefalitis, septicemia, artritis, endocarditis y abortos. También han sido descritas como presentaciones clínicas, pericarditis, poliserositis, rinitis, abortos y bronconeumonía (Higgins y Gottschalk, 2006). Las formas más frecuentes son la nerviosa y septicémica que representarían en torno al 80% de los casos descritos, mientras que los procesos artríticos, respiratorios y reproductivos han sido descritos en porcentajes menores (Tarradas, 2003). *S. suis* puede afectar a cerdos de todas las edades, pero los lechones son los más susceptibles, tal y como se ha señalado en párrafos anteriores, presentándose la mayoría de los casos entre las 3 y las 12 semanas de vida (MacInnes y Desrosiers, 1999).

En los procesos producidos por *S. suis* que cursan con formas nerviosas, se presenta de manera inicial un síndrome febril más o menos intenso seguido de la aparición rápida de signos neurológicos, incluyendo opistótonos, decúbito lateral, pataleo, convulsiones y ataxia (Reams y col., 1994; Staats y col., 1997). Los cuadros septicémicos cursan con fiebre elevada, pero también de forma asintomática, observándose la muerte súbita en los animales afectados (Reams y col., 1994; Staats y col., 1997). Otras formas de presentación de la enfermedad causada por *S. suis* son los cuadros de artritis (que cursan con un engrosamiento e inflamación de las articulaciones produciendo la cojera del animal) o los trastornos de la reproducción (relacionados con repeticiones de celo y abortos con la expulsión de lechones sin momificar) (Reams y col., 1994; Staats y col., 1997; Tarradas, 2003). Respecto a los procesos neumónicos, *S. suis* suele ser aislado en combinación con otros patógenos

respiratorios, tales como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *H. parasuis* o *Bordetella bronchiseptica* (Galina y col., 1992; Reams y col., 1994).

### 2.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad causada por *S. suis* se basa generalmente en los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y la edad de los animales. La confirmación se obtiene mediante el diagnóstico de laboratorio en base al aislamiento e identificación del agente infeccioso y las lesiones microscópicas presentes en tejidos, ya que el diagnóstico sólo basado en la sintomatología puede inducir a confusión con otros patógenos infecciosos porcinos, tales como por ejemplo *Actinobacillus suis* o *H. parasuis* (MacInnes y Derosiers, 1999), que pueden causar cuadros clínicos similares.

Macroscópicamente los animales afectados muestran un enrojecimiento de la piel con congestión y hemorragias en los órganos parenquimatosos. Tanto cerebro como meninges presentan un aspecto brillante, consecuencia del edema cerebral. Por otro lado, la inflamación supurativa o fibrinopurulenta del cerebro, corazón, pulmones y serosas han sido descritas como las observaciones histopatológicas más comunes y en casos de meningitis es característica la infiltración difusa de células inflamatorias con predominio de neutrófilos (Staats y col., 1997; Higgins y Gottschalk, 2006).

Las muestras deben ser tomadas a partir de los órganos afectados en función del proceso clínico. Para la detección de *S. suis* a partir de animales portadores, la toma de muestras se realiza a partir de tonsilas. Algunos estudios también han sido realizados a partir de hisopos nasales, aunque la mayoría de los estudios sugieren que se obtienen mejores resultados a partir de muestras tonsilares (Clifton-Hadley, 1984; Clifton-Hadley y col., 1984; Moreau y col., 1989).

La confirmación de laboratorio se realiza mediante el aislamiento en medio Agar Columbia con 5% de sangre de cordero suplementado con sulfato de colistina y ácido nalidíxico (Agar Columbia CNA). La incubación se recomienda realizarla en



aerobiosis a 37°C. Tras 24 horas de incubación se pueden visualizar macroscópicamente las colonias de *S. suis* (0,5 a 1 mm de diámetro), grisáceas o transparentes, ligeramente mucosas y con un halo de hemólisis (Staats y col., 1997).

En los inicios del diagnóstico de laboratorio, la identificación a nivel de especie se realizaba utilizando un escaso número de pruebas bioquímicas. Así, Devriese y col. (1991) propusieron el uso de sólo dos pruebas (pero siempre que el organismo fuera aislado de animales enfermos y la serotipificación fuera posible); de este modo un estreptococo  $\alpha$ -hemolítico productor de amilasa pero no de acetoina, podría ser considerado como *S. suis*. Otros autores propusieron la utilización de otras pruebas bioquímicas, de tal forma que aquellos aislados que no sean capaces de crecer en caldo con 6,5% de NaCl, sean Voges-Proskauer negativo, acidifiquen los azúcares salicina y trehalosa, hidrolicen la esculina, sean positivos a la prueba de la amilasa y no muestren  $\beta$ -hemólisis en sangre de ovino, podrían ser también identificados como *S. suis* (Gottschalk y col., 1991a; Tarradas y col., 1994). No obstante, en ocasiones la sintomatología puede no ser clara, complicando de este modo la identificación, y por tanto el diagnóstico. En este caso, sería necesario efectuar un mayor número de pruebas bioquímicas para poder diferenciar *S. suis* de otras especies de estreptococos que pueden aislarse de ganado porcino. En la Tabla 2 se muestran las características bioquímicas que pueden ser de utilidad para diferenciar *S. suis* de otras especies de estreptococos. Actualmente, también se dispone de sistemas comerciales multisustrato (API 20 Strep o Rapid ID32 Strep, bioMérieux) que incluyen un elevado número de pruebas bioquímicas y ofrecen un diagnóstico más rápido (Hommeiz y col., 1986; Fordymacki y col., 1998). Sin embargo, la identificación mediante la realización de pruebas bioquímicas puede no ser exacta debido a la heterogeneidad bioquímica de este microorganismo (Sihvonen y col., 1988; Higgins y Gottschalk, 1990; Gottschalk y col., 1991a; Harel y col., 1994; Tarradas y col., 1994; Fordymacki y col., 1998). Por ello, en la actualidad, se han desarrollado métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la correcta identificación de *S. suis* mediante la amplificación del gen *gdb* (Okwumabua y col., 2003) o de fragmentos específicos del gen 16S ARNr (Marois y col., 2006).

Tabla 2. Características bioquímicas que diferencian las especies de *Streptococcus* aisladas de ganado porcino. 1: *S. suis*, 2: *S. porci*, 3: *S. plurextorum*, 4: *S. porcinus*, 5: *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, 6: *S. alactolyticus*, 7: *S. bovis*, 8: *S. orisuis*, 9: *S. ferus*, 10: *S. thoraltensis*, 11: *S. hyointestinalis*, 12: *S. hyovaginalis*, 13: *S. porcorum*. Símbolos: +: reacción positiva, -: reacción negativa, NG: no agrupable. Las características fenotípicas han sido tomadas de Vela y col. (2010, 2011).

Características bioquímicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Hidrólisis arginina	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Producción de:													
β-Glucosidasa	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
β-Glucuronidasa	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
α-Galactosidasa	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Fosfatasa alcalina	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Acetoina	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Gliciltriptófano arilamidasa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterasa (C4)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Ester lipasa(C8)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Valina arilamidasa	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Cistina arilamidasa	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Fosfatasa ácida	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Naftol AS-BI-fosfohidrolasa	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
β-Galactosidasa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
N-acetil-β glucosaminidasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α-Glucosidasa	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Producción de ácido:													
D-Ribosa	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
D-Manitol	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
D-Sorbitol	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
D-Lactosa	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+

Tabla 2. Continuación.

Características bioquímicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
D-Trehalosa	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
D-Rafinosa	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Pululano	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D-Melibiosa	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Metil- $\beta$ -D-glucopiranosido	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
L-Arabinosa	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Xilosa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Almidón	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Glucógeno	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Antígeno Lancefield	D	B	B	V	C	D	D	D	C	NG	NG	NG	NG

### 2.1.5 Tratamiento y prevención de la infección

La infección por *S. suis* se asocia con la intensificación de la industria porcina, por lo que, para prevenir su aparición, es necesario el control de los factores ambientales y estresantes que pueden desencadenar la aparición de la enfermedad, y que hemos señalado en párrafos anteriores. Así pues, un control adecuado de la ventilación, la realización de un vacío sanitario, un manejo adecuado de los animales así como la aplicación de correctos planes de desinfección y limpieza constituyen la primera línea de defensa contra la instauración de la enfermedad (Robertson y Blackmore, 1987; Alexander, 1990; Quiles y col., 2008).

Para evitar la mortalidad causada por estreptococos, el control de las infecciones en las instalaciones porcinas se ha basado, además de en una gestión

eficiente, en el uso de antibióticos y en la vacunación (Dee y col., 1993; Kataoka y col., 2000).

Como agentes antimicrobianos, los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y fenicoles han sido utilizados para el tratamiento y la prevención de la infección por *S. suis* (Gottschalk y col., 1991c; Marie y col., 2002; Escudero y col., 2007). Sin embargo, el uso continuado e indiscriminado de los antimicrobianos en la industria porcina ha conducido al aumento y el desarrollo de resistencias durante los últimos años. Se han observado resistencias e incluso patrones de multirresistencia frente a muchos antibióticos, como por ejemplo, la penicilina, tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos, clindamicina y fluoroquinolonas, que pueden variar según el origen geográfico de la cepa (Aarestrup y col., 1998b; Kataoka y col., 2000; Martel y col., 2001; Escudero y col., 2007). Estos problemas que plantea la antibioterapia, hacen necesario la búsqueda de nuevas alternativas en el control de la infección causada por este microorganismo, tales como el uso de bacteriocinas. Un reciente estudio ha descrito la actividad sinérgica de la nisina, una clase de bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, en combinación con otros antibióticos de uso común, por lo que podría ser considerada de interés en el control de la infección (Lebel y col., 2013).

En los últimos años la investigación se ha centrado en el desarrollo de vacunas. Se han realizado diversos ensayos de inmunización que incluyen el uso de bacterinas autógenas. La principal dificultad que presentan estas autovacunas son los diferentes serotipos que se encuentran presentes en una sola explotación y la ausencia de reacciones cruzadas entre serotipos (Baums y Valentin-Weigand, 2009). Además, se han señalado una serie de desventajas adicionales, tales como la falta de seguridad de las vacunas y las graves reacciones adversas a los adyuvantes de aceite que a menudo se agregan a este tipo de vacunas (Haesebrouck y col., 2004). Las estrategias de vacunación más recientes se han focalizado en la investigación de varias proteínas asociadas a la virulencia como componentes potenciales para desarrollar vacunas de subunidades. Así por ejemplo, han sido propuestas como posibles vacunas, una elaborada con SLY purificada que indujo buena protección

en cerdos infectados experimentalmente con una cepa de serotipo 2 (Jacobs y col., 1996), u otra que contenía subunidades purificadas de MRP y EF (Wisselink y col., 2001). Sin embargo, dichas vacunas no serían útiles frente a muchas de las cepas norteamericanas que no producen estas proteínas (Gottschalk y col., 1998). Más recientemente, han sido publicados por varios equipos de investigación una serie de potenciales candidatos vacunales, como es el caso de la enolasa o la proteína SAO. Así, Li y col. (2007) demostraron que la inmunización con la proteína SAO recombinante era capaz de provocar una fuerte respuesta humoral, con una disminución de los signos clínicos y la diseminación bacteriana en los protocolos de vacunación de ratón y cerdo. Del mismo modo, Hsueh y col. (2013) obtuvieron buenos resultados de inmunización en ambos modelos animales cuando evaluaron la proteína recombinante SAO-L como vacuna. Asimismo, el potencial vacunal de la enolasa también ha sido investigado, aunque los datos de los distintos estudios han resultado contradictorios. Esgleas y col. (2009) demostraron que era altamente inmunogénica en ratón, pero debido a que el grupo control no vacunado y el vacunado mostraron tasas similares de mortalidad tras el desafío con una cepa de *S. suis* altamente virulenta, dichos autores concluyeron que a pesar de provocar una fuerte respuesta de anticuerpos no aportaba protección eficaz frente a la infección con *S. suis* de serotipo 2 en ratones (Esgleas y col., 2009). No obstante, otro grupo de investigación demostró que la enolasa sí producía una protección completa en ratones (Feng y col., 2009a). En resumen, a pesar de las investigaciones realizadas, todavía no se ha desarrollado una vacuna totalmente eficaz que ofrezca una protección cruzada frente a todos los serotipos de *S. suis*.

### 2.1.6 Caracterización de *S. suis*

#### Serotipificación

Como se ha descrito en párrafos anteriores (ver Capítulo I, apartado 1.3), la serotipificación ha sido tradicionalmente usada para la tipificación de este microorganismo. Los estudios realizados con dicha técnica han demostrado que la

prevalencia y la distribución de los serotipos varían según la zona geográfica. A pesar de ello, el serotipo 2 es el que tiene más relevancia epidemiológica y ha sido considerado el más virulento, estando ampliamente distribuido en todo el mundo (Wisselink y col., 2000; Gottschalk y col., 2007; Wertheim y col., 2009; Fittipaldi y col., 2011). En España, el serotipo 2 ha sido el serotipo dominante con porcentajes de aislamiento variables según el estudio, que pueden oscilar entre el 22% y el 50% (Prieto y col., 1993; Tarradas y col., 1994; Luque y col., 1999; Wisselink y col., 2000). En otros países europeos como Francia o Italia, también ha sido considerado como el serotipo más prevalente (Berthelot-Hérault y col., 2000; Wisselink y col., 2000; Princivalli y col., 2009), así como en los países asiáticos. En China, casi el 50% de los aislados (incluidos en un estudio realizado con muestras clínicas entre 2003-2007) fueron clasificados como serotipo 2 (Wei y col., 2009). Por otro lado, en Japón se ha señalado un porcentaje algo menor de aislados de serotipo 2, un 28% (Kataoka y col., 1993). En Dinamarca, también ha sido destacado como uno de los serotipos más frecuentes, a pesar de que el serotipo 7 ha sido frecuentemente asociado con procesos clínicos en este país (Tian y col., 2004; Aarestrup y col., 1998a; Aarestrup y col., 1998b). En países como Bélgica, Países Bajos y Alemania, el serotipo 2 está siendo desplazado en los últimos años por el serotipo 9, aumentando su prevalencia en dichas naciones (Jacobs y col., 1995; Wisselink y col., 2000; Allgaier y col., 2001; Silva y col., 2006; Rehm y col., 2007; Schultsz y col., 2012). Del mismo modo, en España se está experimentando un incremento del serotipo 9 como serotipo responsable de muchos de los casos clínicos (Allgaier y col., 2001; Perea y col., 2003; Vela y col., 2003; Tarradas y col., 2004). Por otro lado, en el Reino Unido predominan los serotipos 1 y 14 (Heath y col., 1996; Wisselink y col., 2000; Allgaier y col., 2001) y en Finlandia predomina el serotipo 7 (Sihvonen y col., 1988; Jacobs y col., 1994). En Norteamérica, además del serotipo 2, el serotipo 3 ha sido destacado como prevalente (Messier y col., 2008; Fittipaldi y col., 2009; Gottschalk y col., 2013). Datos recientes de dos estudios realizados en Canadá, muestran porcentajes que oscilan entre 11 y el 25% de *S. suis* serotipo 2 entre las cepas clínicas, durante los años 2001-2011, habiendo sido el serotipo 3 el más prevalente en ciertos años (Messier y col., 2008; Gottschalk

y col., 2013). Del mismo modo, en Estados Unidos los serotipos más prevalentes son el serotipo 3 (20% de los aislamientos) y el serotipo 2 (17%) (Fittipaldi y col., 2009). Estos resultados sugieren la existencia de una similitud entre estos dos países, donde el serotipo 2 y 3 son los más frecuentes.

Algunos autores han establecido una relación entre determinados serotipos y ciertos procesos clínicos, aunque los resultados no han sido concluyentes. En Escandinavia y Europa central, las cepas de serotipo 7 han sido aisladas con frecuencia de lechones con bronconeumonía (Wisselink y col., 2000; Tian y col., 2004; Silva y col., 2006). No obstante, en China este proceso clínico ha sido asociado al serotipo 3 (Wei y col., 2009). Asimismo, Wisselink y col. (2000) investigaron la distribución de serotipos en siete países europeos y propusieron la asociación de diferentes serotipos con diferentes formas clínicas. Así, los serotipos 1, 2, 9, 14 y 22 fueron más frecuentemente asociados a procesos sistémicos, mientras que los serotipos 3, 4, 5, 8, y 25 fueron recuperados principalmente de muestras pulmonares.

Ciertos estudios han sugerido que las cepas procedentes de animales sanos suelen ser más diversas en cuanto a serotipos (Allgaier y col., 2001; Han y col., 2001; Luque y col., 2010; Wang y col., 2013). De hecho, se ha indicado en numerosas ocasiones que los animales sanos pueden actuar como portadores de múltiples serotipos de *S. suis* en sus tonsilas (Staats y col., 1997; Martínez y col., 2002; Marois y col., 2007; Hoa y col., 2011). Asimismo, algunos autores han señalado que los serotipos detectados en aislados clínicos se encuentran presentes entre las cepas procedentes de animales sanos, destacando por ello el relevante papel que los animales portadores pueden desempeñar en el mantenimiento de la infección (Luque y col., 1999; Berthelot-Hérault y col., 2000; Luque y col., 2010; Hoa y col., 2011). Por el contrario, otros autores han indicado que el serotipo detectado como más frecuente entre los aislados procedentes de animales sanos no siempre se corresponde con el más prevalente entre cepas clínicas de una misma región. Así, en China, el serotipo 7 fue el detectado con mayor frecuencia en animales sanos (Wang y col., 2013), los serotipos 16 y 9 los más prevalentes en

Canadá y Corea entre cepas procedentes de animales de matadero (Flores y col., 1993; Han y col., 2001) y el serotipo 22 el más prevalente en Francia (Marois y col., 2007).

Existe un porcentaje de cepas que son consideradas no tipables por la incapacidad de clasificarse en alguno de los serotipos descritos en la actualidad, debido a la ausencia de cápsula o por corresponder a nuevos serotipos aún no descritos. Este porcentaje es variable, siendo menor en el caso de cepas clínicas (Prieto y col., 1993; Wisselink y col., 2000). Los porcentajes relativamente elevados de cepas no tipables han sido descritos en los aislados procedentes de muestras tonsilares. Marois y col. (2007), clasificaron el 58% de las cepas tonsilares de su estudio como no tipables. Resultados similares fueron obtenidos previamente por Han y col. (2001) en Corea. En Canadá entre 2008 y 2011, Gottschalk y col. (2013) señalaron porcentajes variables, que oscilaban entre un 15% y un 33%, destacando que un elevado porcentaje (89%) de dichas cepas no tipables eran probablemente no capsuladas.

### **Caracterización mediante factores de virulencia**

Las proteínas asociadas a la virulencia MRP, EF y SLY han sido ampliamente utilizadas para la caracterización de los aislados de *S. suis*, basándose tanto en la determinación de los genes que codifican para dichas proteínas (genes *mrp*, *epf* y *shy*), así como en la expresión de las mismas. Existe una cierta controversia sobre la asociación de estas proteínas con la virulencia (Staats y col., 1999). Por una parte, varios experimentos realizados en modelos animales han mostrado que tanto las cepas de serotipo 1 como 2 que expresaban las proteínas EF Y MRP, eran más virulentas que las que no expresaban dichas proteínas (Vecht y col., 1991; Smith y col., 1993). Sin embargo, otros estudios realizados con mutantes isogénicos que carecen de MRP, EF o SLY, han determinado que eran tan virulentas como la cepa parental (Smith y col., 1996; Allen y col., 2001; Lun y col., 2003), hecho que sugiere que la ausencia de una o más de estas proteínas no estaría necesariamente asociada con la falta de virulencia.



Existen en la literatura numerosos trabajos (principalmente basados en aislados de serotipo 2) relativos a la presencia o expresión de estas proteínas. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios indican que gran parte de los aislados clínicos de serotipo 2, presentan los genes y/o expresan dichas proteínas en Europa. Así por ejemplo, Wisselink y col. (2000), en un estudio realizado con cepas de diferentes países europeos, indicaron que el 71% de los aislados de serotipo 2 mostraban los fenotipos MRP+/EF+, MRP<sup>s</sup>/EF+ o MRP-/EF+. Asimismo, en España, Luque y col. (1999) hallaron que el 84% de los aislados expresaban las proteínas MRP y EF; resultados similares fueron obtenidos años más tarde por Blume y col. (2009) quienes detectaron un elevado porcentaje de cepas que expresaban el fenotipo MRP+/EF+/SLY+.

Sin embargo, la expresión de estas proteínas por las cepas norteamericanas difiere de lo observado en las cepas europeas. Tanto en Canadá como Estados Unidos, la producción de estas proteínas se ha observado en un número limitado de cepas de serotipo 2. Así por ejemplo, Gottschalk y col. (2013) no detectaron las proteínas EF y SLY (siendo la producción de MRP variable) entre las cepas canadienses de serotipo 2 que fueron investigadas. Estudios previos habían indicado resultados similares (Gottschalk y col., 1998; Fittipaldi y col., 2011). El estudio realizado por Fittipaldi y col. (2009) con cepas estadounidenses reveló la presencia de dos fenotipos frecuentes MRP+/EF-/SLY- (40%) y MRP-/EF-/SLY+ (35%). En base a estos resultados, se ha propuesto la hipótesis de que las cepas europeas de serotipo 2, especialmente aquellas que expresan MRP, EF y SLY, podrían ser más virulentas que las cepas de serotipo 2 de América del Norte (Gottschalk y Segura, 2000). Por otro lado, también se ha investigado la presencia de estas proteínas mediante la detección de los genes que codifican para las mismas. Tanto en Alemania como en Italia, el genotipo *mrp*+/*epf*+(o *epf*<sup>\*</sup>)/*slh*+ ha sido el genotipo más prevalente asociado con cepas invasivas de serotipo 2 (Rehm y col., 2007; Princivalli y col., 2009). Asimismo, en los países asiáticos se ha asociado la presencia de estas proteínas con las cepas clínicas de serotipo 2. Wei y col. (2009), así como Tang y col. (2011), señalaron que el genotipo *mrp*+/*epf*+/*slh*+ era el más

prevalente. Del mismo modo, Rui y col. (2012) también hallaron *mmp*<sup>+</sup>/*epf*<sup>+</sup> con la presencia de *shy* variable como genotipo más frecuente.

Respecto a la expresión de estas proteínas asociadas al serotipo 9, Wisselink y col. (2000) estudiaron la expresión de los factores MRP y EF en aislados clínicos procedentes de siete países europeos y observaron que la mayoría de los aislados de serotipo 9 mostraban el fenotipo MRP<sup>\*</sup>/EF<sup>-</sup>. Este resultado estaría de acuerdo con lo descrito en el estudio de Allgaier y col. (2001), quienes observaron una correlación entre el serotipo 9 y el fenotipo MRP<sup>+</sup>(o sus variantes)/EF<sup>-</sup>. En España, Luque y col. (1999) determinaron que la mayoría de los aislados de serotipo 9 investigados presentaban el fenotipo MRP<sup>-</sup>/EF<sup>-</sup> o bien MRP<sup>\*</sup>/EF<sup>-</sup>. Otro estudio más reciente ha puesto de manifiesto que los fenotipos predominantes en la población de aislados españoles de serotipo 9 serían MRP<sup>-</sup>/EF<sup>-</sup>/SLY<sup>+</sup> (65%) y MRP<sup>-</sup>/EF<sup>-</sup>/SLY<sup>-</sup> (32%) (Blume y col., 2009). También se ha investigado la distribución de los genes que codifican para dichas proteínas entre aislados pertenecientes al serotipo 9. Ciertos autores han establecido una asociación entre la presencia de la variante *mmp*<sup>\*</sup> y las cepas clínicas en Centroeuropa (Wisselink y col., 2000; Silva y col., 2006; Rehm y col., 2007; Princivalli y col., 2009). De hecho Silva y col. (2006) señalaron que la gran mayoría de los aislados procedentes de casos invasivos de serotipo 9 presentaban el genotipo *mmp*<sup>\*</sup>/*epf*<sup>-</sup>/*shy*<sup>+</sup>.

Respecto a las cepas pertenecientes al serotipo 7, Wisselink y col. (2000) asociaron las cepas clínicas de dicho serotipo con el fenotipo MRP<sup>-</sup>/EF<sup>-</sup>, resultados similares a los obtenidos por Allgaier y col. (2001) y Berthelot-Hérault y col. (2000). Por otra parte, los serotipos 1 y 14 obtenidos de cerdos enfermos procedentes de Europa han sido asociados con la expresión de EF y una expresión de la proteína MRP variable (Wisselink y col., 2000).

Cuando se ha comparado la expresión de estas proteínas entre aislados procedentes de animales portadores y enfermos, se ha observado que las proteínas se expresan en mayor medida en los aislados clínicos, independientemente del serotipo asignado (Berthelot-Hérault y col., 2000; Wisselink y col., 2000; Tarradas y col., 2001a; Silva y col., 2006; Wang y col., 2013). Resultados obtenidos por

Tarradas y col. (2001a) mostraron que los aislados clínicos expresaban SLY en mayor porcentaje que los tonsilares. Del mismo modo, se han detectado diferencias respecto a la presencia de los tres genes *mrp*, *epf* y *sly* entre aislados clínicos y tonsilares. Así, Fabisiak y col. (2005) investigaron la presencia del gen *sly* y detectaron dicho gen en un 85% de los aislados clínicos mientras que sólo lo presentaban el 63% de los aislados procedentes de animales portadores. Silva y col. (2006) mostraron que un 47% de los aislados clínicos de serotipo 2 presentaban el genotipo *mrp*+/*epf*+/*sly*+, mientras que tan sólo el 20% de los animales portadores lo presentaban. Un estudio realizado en China con aislados procedentes de distintos mataderos mostró que el porcentaje de cepas que no presentaban ninguno de los genes, *mrp*, *epf* o *sly* era superior (31.1%) al porcentaje de aislados que sí presentaban dichos genes (6.6 %) (Wang y col., 2013).

A pesar de que en los últimos años han sido propuestos numerosos factores relacionados con la patogenicidad de *S. suis*, en la actualidad existen escasos estudios en los que se hayan investigado otros factores relacionados con la virulencia, diferentes a los anteriormente mencionados, para la caracterización de cepas de *S. suis*. Entre dichos estudios, podríamos señalar el desarrollado por Feng y col. (2007), quienes investigaron la presencia del gen *sao* y sus respectivas variantes en las cepas de referencia de diferentes serotipos y un conjunto de aislados de serotipo 2. Estos autores señalaron que la variante del gen *sao-M* era detectada en el 80% de las cepas estudiadas y por tanto era la variante más prevalente. También, la presencia de la isla de patogenicidad 89K ha sido investigada en un conjunto de aislados clínicos porcinos procedentes de Estados Unidos, pero no fue detectada en ninguno de los aislados incluidos en el estudio (Schmid y col., 2011). Sin embargo, Wang y col. (2012) indicaron su presencia en un elevado porcentaje (82%) de aislados de serotipo 2 obtenidos de cerdos sanos procedentes de diferentes regiones del noreste de China, indicando que la detección de la isla de patogenicidad debería realizarse como parte de la rutina de vigilancia en esta área geográfica. Para la caracterización de *S. suis* también se ha investigado la presencia de los distintos grupos genéticos que codifican para pilis. Así, Takamatsu y col. (2009) clasificaron un conjunto de aislados clínicos y tonsilares, tanto porcinos como humanos, en

base a la presencia de genes que forman parte de cuatro grupos genéticos asociados a los pilis, denominados *strBCD*, *strE*, *strF* y *strG*. En dicho estudio se obtuvieron 12 genotipos, siendo los más prevalentes los genotipos A y B que estuvieron correlacionados con los perfiles alélicos de relevancia sanitaria, ST1 y ST27, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos posteriormente por Tang y col. (2011). Asimismo, en Norteamérica, Fittipaldi y col. (2011) investigaron la relación existente entre la expresión de las proteínas SLY, EF y MRP, además de los grupos genéticos *strF* y *strG* y los ST prevalentes en dicha área geográfica. Dichos autores establecieron una asociación entre los perfiles alélicos ST25 y ST28 y los perfiles de expresión MRP-/EF-/SLY-/*strF*-/*strG*+ y MRP+/EF-/SLY-/*strF*+/*strG*+, respectivamente.

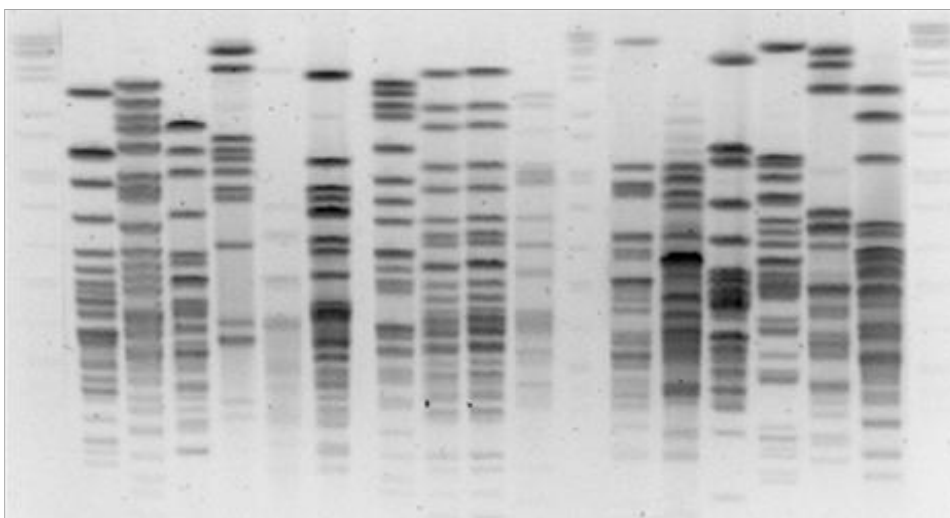
### Caracterización mediante técnicas moleculares

La tipificación genética permite determinar las relaciones entre aislados idénticos bioquímicamente, del mismo serotipo, procedentes de diferente origen clínico o portador, diversas localizaciones geográficas o diferentes años y por tanto, permite establecer el grado de diversidad genética que presenta un microorganismo.

Los resultados de los estudios de caracterización molecular han mostrado que *S. suis* presenta una elevada diversidad genética mediante el uso de diversas técnicas, tales como REA (Mogollon y col., 1990), RFLP (Okwumabua y col., 1995), ribotipado (Beaudoin y col., 1992a; Harel y col., 1994; Staats y col., 1998), RAPD (Chatelier y col., 1999; Martínez y col., 2002) o PFGE (Berthelot-Hérault y col., 2002; Vela y col., 2003; Blume y col., 2009) (Figura 6). A pesar de esta amplia diversidad, las técnicas de caracterización molecular han permitido establecer un cierto grado de relación genética entre los aislados, estableciendo grupos genéticos con respecto al serotipo, origen clínico o geográfico.

Varios autores han investigado la diversidad genética presente tanto entre aislados de distintos serotipos (Harel y col., 1994; Okwumabua y col., 1995) como dentro del mismo serotipo (Mogollon y col., 1990; Berthelot-Hérault y col., 2002;

Martínez y col., 2002; Vela y col., 2003). Así por ejemplo, Vela y col. (2003) investigaron la variabilidad genética por PFGE de aislados clínicos en nuestro país. Los resultados determinaron una notable diversidad tanto entre serotipos como entre los aislados del mismo serotipo. Resultados similares han sido obtenidos por diversos autores, no sólo mediante el análisis por PFGE (Berthelot-Hérault y col., 2002; Tian y col., 2004; Luey y col., 2007; Blume y col., 2009), sino por otras técnicas tales como REA (Mogollon y col., 1990), RFLP (Okwumabua y col., 1995) ribotipado (Beaudoin y col., 1992a; Staats y col., 1998) o RAPD (Chatelier y col., 1999; Martínez y col., 2002).



**Figura 6.** Patrones de restricción PFGE de aislados de *S. suis*. Carriles 1, 12 y 19: control estándar de peso molecular *Salmonella enterica* serovar Braendorup H9812, resto de carriles: aislados de *S. suis* serotipo 9 procedentes de ganado porcino en nuestro país.

A pesar de la diversidad que muestra este microorganismo, se ha podido establecer una cierta relación entre serotipos y ciertos grupos genéticos. A este respecto, Blume y col. (2009) observaron una marcada agrupación de los aislados en dos grupos genéticos acorde al serotipo. Estos resultados corroboran lo descrito

previamente por Vela y col. (2003), quienes establecieron una asociación estadísticamente significativa entre tres grupos genéticos y los serotipos 2, 7 y 9. Resultados similares han sido descritos tras la utilización de otras técnicas como AFLP (Rehm y col., 2007) o MLEE (Hampson y col., 1993). Mediante la técnica MLST, a pesar de que algunos ST pueden incluir aislados de diferentes serotipos (King y col., 2002), también se ha establecido una asociación de ciertos serotipos con determinados CC. Así, tanto en España como en el resto de Europa, los aislados clínicos correspondientes al serotipo 2 (Blume y col., 2009; Princivalli y col., 2009; Schultsz y col., 2012) se encuentran asociados al CC1, mientras que aislados de serotipo 9 han sido incluidos en diferentes CC, como el CC61 en España (Blume y col., 2009) o el CC16 en los Países Bajos (Schultsz y col., 2012). Sin embargo, en otros estudios no se ha establecido una relación genética tan clara entre los aislados de un mismo serotipo. Así, Berthelot-Hérault y col. (2002) destacaron que mientras los serotipos 1/2, 3 y 9 eran estadísticamente asociados a grupos particulares por PFGE, no obstante, los aislados de serotipo 2 eran asociados a diferentes grupos. Resultados similares fueron obtenidos por Allgaier y col. (2001) quienes observaron que ciertos serotipos formaban parte de todos los grupos genéticos que se determinaron mediante PFGE.

En la bibliografía existen numerosos trabajos en los que se ha estudiado la posible relación entre los aislados en función de su origen (si es clínico o no). Así, ciertos estudios que han investigado aislados procedentes de animales tanto portadores como clínicos, han revelado la mayor heterogeneidad genética presente entre aislados tonsilares (Beaudoin y col., 1992a; Allgaier y col., 2001; Berthelot-Hérault y col., 2002). Asimismo, se ha demostrado que los aislados procedentes de muestras clínicas se clasifican en grupos genéticos distintos a aquellos en los cuales se agrupan aislados procedentes de animales sanos. Por ejemplo, Allgaier y col. (2001) señalaron que los aislados invasivos se agrupaban separados de los procedentes de cerdos sanos, mediante PFGE. Resultados similares fueron obtenidos por Berthelot-Hérault y col. (2002). Sin embargo, otros autores han indicado resultados diferentes. Así por ejemplo, mediante RAPD, Chatelier y col. (1999) demostraron que los aislados clínicos y los aislados procedentes de animales

portadores estaban muy relacionados genéticamente y que no se agrupaban de forma independiente. Con otras técnicas se han obtenido resultados semejantes. Estudios realizados con la técnica MLST han mostrado que los aislados de portadores forman parte de algunos ST que incluyen también aislados clínicos; de hecho, King y col. (2002) indicaron que los 22 ST en los cuales se clasificaban aislados procedentes de animales portadores, también incluían aislados de origen clínico. Estudios posteriores realizados con esta misma técnica han clasificado a los aislados de serotipo 2 procedentes de animales sanos en el ST1 o ST7, perfiles alélicos considerados de relevancia sanitaria por ser responsables de un número elevado de casos clínicos en el cerdo y en el hombre (Hoa y col., 2011; Wang y col., 2012, 2013).

Por otro lado, ciertos estudios han clasificado los aislados de *S. suis* en función del tipo de proceso clínico. Así, Rehm y col. (2007) observaron mediante AFLP que los aislados procedentes de casos clínicos invasivos se agrupaban separadamente de aquellos aislados procedentes de neumonía. Resultados similares fueron obtenidos por Allgaier y col. (2001) mediante PFGE. Del mismo modo, otro estudio realizado por Rasmussen y col. (1999) también reveló una marcada asociación de ciertos ribotipos con determinados procesos clínicos. Acorde con estos estudios, el análisis por MLST realizado por King y col. (2002) también mostró una cierta relación entre los CC descritos como más prevalentes y el origen clínico de los aislados. Así, el CC1 incluía una elevada proporción de aislados procedentes de casos clínicos típicamente invasivos, como septicemia, meningitis y artritis, mientras que los complejos CC27 y CC87 agrupaban una elevada proporción de aislados de pulmón.

Tal y como hemos detallado en párrafos anteriores, *S. suis* ha sido descrito como una especie bacteriana que presenta una gran diversidad. A pesar de este hecho, se ha descrito la existencia de ciertos clones que son más prevalentes entre la población de este patógeno. Así, mediante PFGE se ha destacado la existencia de ciertos pulsotipos más prevalentes, como demuestra un estudio realizado en España en el cual se determinó la presencia de un perfil de PFGE predominante y detectado a lo largo de varios meses e incluso años en varias explotaciones

españolas (Vela y col., 2003). Resultados similares se han obtenido por ribotipado analizando aislados daneses (Rasmussen y col., 1999) o mediante REA con aislados de *S. suis* procedentes de animales con meningitis y neumonía (Mogollon y col., 1990). Del mismo modo, Martínez y col. (2002) clasificaron algunos aislados procedentes de diferentes piaras de cerdos en el mismo perfil mediante RAPD. Utilizando esta misma técnica, Chatellier y col. (1999) detectaron varios clones prevalentes entre los aislados de serotipo 2 procedentes de animales enfermos y portadores de diferentes orígenes geográficos. Finalmente, también por MLST se ha observado una mayor prevalencia de ciertos clones. Así por ejemplo, King y col. (2002) detectaron la existencia de tres clones dominantes en la población de *S. suis*: los complejos clonales CC1, CC27 y CC87, siendo el CC1 el que agrupaba un mayor número de aislados e incluía aislados de varios países, por lo que fue designado como el clon más prevalente a nivel mundial.

Los resultados obtenidos mediante MLST han permitido extraer importantes conclusiones respecto a las relaciones genéticas presentes entre los aislados de los distintos serotipos y procedentes de distintos países. Respecto al serotipo 2, se ha determinado que el CC1 incluye aislados procedentes tanto de animales sanos como enfermos (Tang y col., 2006; Wang y col., 2012, 2013; Zhu y col., 2013; <http://ssuis.mlst.net>). En el caso de China, Wang y col. (2012, 2013) mostraron la elevada prevalencia de aislados procedentes de animales sanos clasificados en el ST1 o ST7, pertenecientes al CC1. En Vietnam, el ST1 también ha sido destacado como el más prevalente en base al elevado porcentaje (80%) de aislados de serotipo 2 procedentes de muestras obtenidas de mataderos, mientras el 20% restante eran incluidos en el ST28 (perteneciente al CC27) (Hoa y col., 2011). En Europa, el CC1 también ha sido descrito como el clon dominante. Así, aislados clínicos porcinos de distintos países han sido en su mayoría incluidos en el ST1, como por ejemplo España (Blume y col., 2009), Países Bajos (Schultsz y col., 2012), Italia (Principalli y col., 2009) o Reino Unido (<http://ssuis.mlst.net>) (Figura 7). A diferencia de la situación observada en Asia y Europa, en Norteamérica sólo un pequeño porcentaje (5%) de los aislados clínicos se encuentran asignados al clon virulento ST1, mientras que la mayoría son asignados al ST25 y ST28 (Fittipaldi y col., 2011).



Dichos ST fueron considerados menos virulentos que el clon ST1, hecho que ha sido relacionado con la baja prevalencia de enfermedad en el hombre en Norteamérica (Fittipaldi y col., 2011). Respecto al serotipo 9, los aislados han sido asociados a distintos CC dependiendo del país de origen. King y col. (2002) y Rehm y col. (2007) hallaron una cierta asociación entre los aislados invasivos de serotipo 9 y el CC87. En España, los ST descritos como más prevalentes entre los aislados clínicos porcinos, han sido el ST123 y ST125 (Blume y col., 2009) (Figura 7), mientras que en los Países Bajos se han asociado al ST16 (Schultsz y col., 2012). En el caso del serotipo 7, los estudios que han incluido aislados de animales enfermos o portadores pertenecientes a dicho serotipo han sido asignados en gran parte al ST29 (Rehm y col., 2007; Schultsz y col., 2012; Wang y col., 2013).



**Figura 7. Distribución de los ST frecuentes detectados en España. Los perfiles alélicos ST123 y ST125 (serotipo 9) han sido detectados exclusivamente en España (color azul) mientras que el ST1 (serotipo 2; color rojo) ha sido detectado a nivel mundial (<http://ssuis.mlst.net>).**

Además de las numerosas técnicas descritas en esta revisión bibliográfica utilizadas para la tipificación de aislados de *S. suis*, recientemente se ha descrito un nuevo método denominado MLVA, tal y como hemos indicado en párrafos

anteriores (ver apartado 1.3). Li y col. (2010) aplicaron por primera vez esta metodología en un conjunto de aislados de *S. suis* porcinos y humanos implicados en los brotes ocurridos en China en los años 1998 y 2005. Los aislados estudiados, que habían sido previamente caracterizados en el mismo pulsotipo por PFGE y en el ST7 (perteneciente al CC1) por MLST, fueron clasificados mediante MLVA en 34 perfiles genéticos, mostrando un mayor poder de discriminación que PFGE y MLST. Sin embargo, la información que disponemos sobre la aplicación de esta técnica para la caracterización de *S. suis* es limitada necesitando realizar más estudios que ayuden a evaluar su poder de discriminación comparado con otras técnicas genotípicas.

## 2.2 Infección por *S. suis* en otros animales

Aunque el cerdo es el principal reservorio de esta bacteria, este microorganismo ha sido aislado de otros animales, tales como el perro, caballo, gato, rumiantes, jabalí o incluso aves (Hommeiz y col., 1988; Devriese y col., 1990, 1992, 1993, 1994; Salasia y col., 1994; Baums y col., 2007).

En el caso del jabalí, dicha especie animal ha sido propuesta como un reservorio importante de *S. suis*. Baums y col. (2007) investigaron la prevalencia de *S. suis* en la población de jabalíes del noreste de Alemania comparada con la presente en el cerdo. Los resultados de dicho estudio mostraron que la prevalencia de *S. suis* serotipo 2 (11%) era similar a la obtenida en el cerdo (14%), mientras que el serotipo 9 fue detectado con mayor frecuencia en el jabalí (22%) que en el cerdo (2%). Sin embargo, el serotipo 1 no fue detectado en la población de jabalíes y el serotipo 7 fue detectado en porcentajes bajos, tanto en el cerdo como en el jabalí (3,2% y 2%, respectivamente). Por otra parte, dichos autores sugirieron que los jabalíes pueden ser portadores de cepas virulentas potencialmente zoonóticas, en base al elevado porcentaje de aislados de *S. suis* serotipo 2 que compartieron el mismo perfil de genes asociados a la virulencia (*mvp*+/*epf*\*/*sly*+) que aislados humanos europeos y a los resultados obtenidos mediante análisis por AFLP, que

agruparon aislados procedentes de jabalíes y humanos en los mismos grupos genéticos. A este respecto, también se han descrito en la literatura varios casos de meningitis por *S. suis* en cazadores en contacto con jabalíes o cerdos salvajes (Grebe y col., 1997; Halaby y col., 2000; Rosenkranz y col., 2003).

Además del jabalí, *S. suis* ha sido aislado de otras especies animales. Así, Devriese y col. (1994) diagnosticaron varios casos de infección por *S. suis* en diferentes especies aviares, todos ellos cuadros septicémicos asociados al serotipo 9, por lo que dichos autores propusieron que *S. suis* debe ser considerado en el diagnóstico diferencial de septicemia en aves. Asimismo, ha sido descrito en varias ocasiones el aislamiento de *S. suis* a partir de diversas especies de rumiantes. Hommez y col. (1988) describieron el aislamiento de *S. suis* a partir de ganado vacuno, ovino y caprino, que presentaba lesiones supurativas, sin embargo todos los casos fueron esporádicos y sólo uno fue relacionado con la presencia de cerdos en la granja. La mayoría de dichos aislamientos no fueron tipables y sólo fue detectado un aislado de serotipo 5 y otro de serotipo 2. Del mismo modo, Gottschalk y col. (1989) identificaron dos cepas de serotipo 9 procedentes de un bisonte y un cordero con endocarditis y propusieron una cepa procedente de un ternero enfermo como cepa de referencia para el serotipo 20. En 1990, un caso de meningitis en caballo fue descrito en Bélgica por Devriese y col., quienes además señalaron que *S. suis* podría ser considerado como miembro de la flora intestinal de vacas, ovejas, cabras y caballos. Asimismo, *S. suis* ha sido aislado de otros rumiantes silvestres como el gamo (Devriese y col., 1993).

En las especies domésticas perro y gato, también ha sido descrito el aislamiento de este microorganismo. Se ha considerado que *S. suis* forma parte de la flora bacteriana que habita en las tonsilas (Devriese y col., 1992) y ha sido asociado como causante de la enfermedad en ambas especies domésticas (Roels y col., 2009; Muckle y col., 2010). Estos hallazgos revelan que *S. suis* no sólo puede ser patógeno para la especie porcina sino también puede afectar a un amplio rango de especies animales.

### 3. Infección por *S. suis* en el hombre

El primer caso de infección en el hombre causado por *S. suis* fue documentado en Dinamarca en el año 1968 (Perch y col., 1968), desde entonces el número de casos se ha incrementado hasta más de 700 en los últimos años. Se han descrito casos por todo el mundo, en muchos países europeos, del continente asiático, así como en Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos, Chile y Argentina (Gottschalk y col., 2007; Taipa y col., 2008; Wertheim y col., 2009; Feng y col., 2014).

Tradicionalmente ha sido considerada una enfermedad ocupacional asociada a casos esporádicos que afecta principalmente a personas que poseen trabajos relacionados con la producción porcina, tales como granjeros, matarifes, carniceros o veterinarios (Taipa y col., 2008; Wertheim y col., 2009). Sin embargo, esta idea cambió tras los brotes acontecidos en China en los años 1998 y 2005 (Ye y col., 2006; Yu y col., 2006) con un elevado número de personas afectadas. La infección por *S. suis* ha cobrado desde entonces gran importancia como enfermedad zoonótica y se ha convertido en un problema de Salud Pública, principalmente en los países asiáticos donde se produjeron dichos brotes y donde se describe el mayor número de casos.

La puerta de entrada de este microorganismo suele ser abrasiones o lesiones en la piel (Arends y Zanen, 1988) de personas que se encuentran en contacto directo con animales infectados o con sus productos. Además, la ingestión de alimentos contaminados se ha propuesto como otra posible vía de infección (Bahloul y col., 2008); por tanto, además de la exposición ocupacional, se considera que el procesado o el consumo de cerdo sin cocinar o parcialmente cocinado podrían ser importantes fuentes de infección (Wertheim y col., 2009).

La meningitis es la manifestación clínica más común, de hecho *S. suis* es considerado la causa principal de meningitis en adultos en Vietnam, así como la tercera causa más común de meningitis bacteriana en Hong Kong (Hui y col., 2005;

Ip y col., 2007; Mai y col., 2008; Wertheim y col., 2009). También se pueden presentar otras manifestaciones clínicas (Gottschalk y col., 2007), entre ellas el shock séptico (*streptococcal toxic shock-like syndrome*) asociado a los brotes acontecidos en China (Tang y col., 2006; Yu y col., 2006; Gottschalk y col., 2010).

La mayoría de los casos han sido atribuidos al serotipo 2 (Gottschalk y col., 2007). Sin embargo, se han descrito infecciones causadas por otros serotipos como el 4, 5, 14, 16 o 24 (Arends y Zanen, 1988; Nghia y col., 2008; Haleis, y col., 2009; Kerdsin y col., 2009, 2011a).

Como se ha mencionado anteriormente, los brotes que se produjeron en China durante los años 1998 y 2005 han sido ampliamente investigados debido a su gran repercusión en Salud Pública. Chen y col. (2007) describieron la isla de patogenicidad 89K que ha sido vinculada a la virulencia de dichos brotes, aunque también ha sido detectada en aislados procedentes de casos esporádicos de otras regiones en China y Tailandia (Feng y col., 2009b; Kerdsin y col., 2009, 2011b). Asimismo, se ha investigado la relación epidemiológica existente entre ambos brotes, así como con el brote porcino que aconteció en 2005 de forma simultánea a uno de ellos. El análisis mediante MLST mostró que las cepas recuperadas del brote humano de 2005 pertenecían al mismo clon responsable del brote porcino y también del brote de 1998. Todas las cepas, a excepción de dos, pertenecieron al ST7 incluido en el CC1 (Ye y col., 2006).

A pesar de que la mayoría de los aislados humanos también se encuentran incluidos en el CC1, se han descrito otros ST y CC diferentes. En Vietnam, los aislados se han incluido en el CC1 perteneciendo la mayoría al ST1. En Tailandia, los aislados de serotipo 2 han sido asignados al CC1 y a otros complejos clonales como el CC104 (el segundo más frecuente en Tailandia), el CC27 y CC29, mientras que la gran mayoría de los aislados de serotipo 14 fueron asignados al ST105 y ST127, incluidos ambos en el CC1 (Mai y col., 2008; Takamatsu y col., 2008; Kerdsin y col., 2009, 2011b; Takeuchi y col., 2012). En los Países Bajos, los aislados humanos se han distribuido entre los complejos clonales CC1 y CC20 (Schultsz y col., 2012).

Respecto a los factores asociados a la virulencia presentes en las cepas de origen humano, la mayoría de los aislados muestran los genes que codifican para las proteínas MRP, EF y SLY (Ye y col., 2006; Yu y col., 2006; Kerdsin y col., 2009); de hecho, dichos factores asociados a la virulencia fueron detectados en las cepas implicadas en los brotes chinos (Ye y col., 2006; Yu y col., 2006). Asimismo, muchos de los aislados europeos de serotipo 2, además de presentar dichos genes, han sido asociados con la variante *ep*/\* (Smith y col., 1993; Rehm y col., 2007).



## Capítulo II

### Objetivos

---





*S. suis* es un patógeno de especial relevancia para el sector porcino a nivel mundial, que causa gran variedad de procesos clínicos en el ganado porcino, principalmente meningitis, pero también cuadros septicémicos, artritis, endocarditis y neumonías. Además, *S. suis* se considera una bacteria de carácter zoonótico, asociada con infecciones de carácter ocupacional en el hombre.

Los estudios epidemiológicos de *S. suis* se han centrado principalmente en el cerdo y en el hombre. Respecto al ganado porcino, estas investigaciones han incluido animales criados en sistemas intensivos, existiendo un desconocimiento sobre las características de la población de *S. suis* presente en otros sistemas de producción, como el extensivo ligado al cerdo ibérico. En nuestro país, el cerdo ibérico es una raza autóctona adaptada al ecosistema mediterráneo, cuya producción se considera de gran importancia económica y está experimentando un fuerte crecimiento. A pesar de este hecho, no existen datos sobre la distribución y las características moleculares de la población de *S. suis* presente en estos animales.

Por otra parte, existe hasta la fecha una escasa e incompleta información sobre los posibles reservorios de *S. suis*, hecho que es necesario investigar si queremos tener una información más completa sobre la epidemiología de este microorganismo. A este respecto, numerosas investigaciones han señalado el destacado papel que la fauna silvestre desempeña en el mantenimiento y la diseminación de determinados patógenos. No obstante, apenas existen datos respecto al papel de los animales silvestres en la epidemiología de *S. suis*.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral investigamos la presencia de *S. suis* y realizamos la caracterización de los aislados de cerdo ibérico y de dos especies de gran interés cinegético en España, como son el jabalí (*Sus scrofa*) y el conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*), con el objetivo de determinar la posible relación existente entre estos y los obtenidos de ganado porcino (cerdo blanco) y así establecer el papel que pueden desempeñar en la epidemiología de este patógeno. La tipificación de los aislados de *S. suis* se realizó mediante la determinación del serotipo y la caracterización genética mediante el empleo de cuatro técnicas moleculares (PFGE, MLST, MLVA y el genotipado basado en perfiles de determinados genes

relacionados con la virulencia). Las dos primeras han sido ampliamente utilizadas en la tipificación molecular de *S. suis*, no obstante, presentan una serie de limitaciones. Es por ello que planteamos el estudio de técnicas alternativas para este fin, como MLVA y el genotipado basado en perfiles de determinados genes (presencia/ausencia) asociados con la virulencia. Ambas técnicas han mostrado ser de gran utilidad para la tipificación de diversos microorganismos, sin embargo, existe escasa información referente a su utilidad para la caracterización de *S. suis*.

Considerando todo lo expuesto hasta el momento, hemos desarrollado la presente Tesis Doctoral con el objetivo general de incrementar el conocimiento que actualmente disponemos sobre la epidemiología de *S. suis*, y para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- Determinación de la frecuencia de aislamiento de *S. suis* en animales silvestres (jabalíes y conejos) y de las principales características serológicas y moleculares de los aislados procedentes de estas poblaciones animales.
- Determinación de la frecuencia de aislamiento de *S. suis* en cerdo ibérico y comparación, tanto serológica como molecular, de dichos aislados con los procedentes de cerdo blanco.
- Comparación serológica y molecular de los aislados obtenidos de poblaciones silvestres y ganado porcino, con especial referencia a la investigación de posibles reservorios.

## Capítulo III

### Resultados

---



**Capítulo III.I**  
**Caracterización de aislados de**  
***S. suis* procedentes de conejo**  
**silvestre y jabalí en España**

---



Además del ganado porcino, *S. suis* ha sido asociado con infecciones esporádicas en otras especies de mamíferos, e incluso aves (Hommeiz y col., 1988; Devriese y col., 1990, 1992, 1993, 1994; Salasia y col., 1994). Sin embargo, apenas se han realizado estudios de investigación que incluyan aislados procedentes de estas especies animales, como por ejemplo las silvestres, a pesar de que se ha demostrado que dichas poblaciones pueden llegar a desempeñar un papel destacado en la transmisión de enfermedades de relevante importancia en Sanidad Animal (Baums y col., 2007; Meng y col., 2009; Boadella y col., 2012).

El jabalí y el conejo son consideradas especies silvestres de gran interés en nuestro país. El conejo silvestre representa un papel ecológico relevante como presa principal de especies endémicas y constituye una de las principales piezas de caza (Delibes-Mateos y col., 2008; Gálvez y col., 2009). Asimismo, ha sido descrito como reservorio de importantes patógenos (Cutler y col., 2010; Maio y col., 2011). Por otro lado, el jabalí, ha sido descrito como especie portadora de cepas de *S. suis* potencialmente patógenas tanto para el cerdo como para el hombre (Baums y col., 2007). Además, en las últimas décadas se ha registrado un aumento considerable de la población de jabalíes. Este hecho puede favorecer el contacto entre estos animales silvestres y el cerdo criado en extensivo, con el riesgo que ello podría suponer en la transmisión de enfermedades entre ambas especies animales.

En consecuencia, el objetivo de incluir este capítulo fue investigar la presencia de *S. suis* en el conejo silvestre (Estudio 1) y el jabalí (Estudio 2), así como llegar a determinar el papel que ambas pueden representar en la complicada epidemiología de *S. suis*. Las características de los aislados de este microorganismo fueron analizadas tras la serotipificación y la aplicación de diversas técnicas de caracterización molecular (PFGE, MLST y la detección de diversos genes asociados a la virulencia).

Ambas poblaciones silvestres estaban colonizadas por este microorganismo en sus tonsilas en porcentajes relativamente elevados (superiores al 30%). Los aislados fueron caracterizados mayoritariamente como serotipo 9. No obstante, la aplicación de las diferentes técnicas de caracterización molecular permitió evidenciar un grado



de diversidad diferente en la población de *S. suis* procedente de jabalí y la de conejo silvestre (siendo ésta superior en la de jabalí), y permitió determinar que ambas poblaciones no estaban relacionadas entre sí y que presentaban características genéticas diferentes a los aislados de la población porcina. Así, los aislados de *S. suis* procedentes de estas especies silvestres no presentaron perfiles alélicos relacionados mediante MLST con los distribuidos en el ganado porcino, ni presentaron los mismos genotipos de genes relacionados con la virulencia asociados frecuentemente con aislados clínicos porcinos procedentes de España o del resto de Europa (Wisselink y col., 2000; King y col., 2002; Silva y col., 2006; Rehm y col., 2007; Blume y col., 2009). En consecuencia, tanto el conejo silvestre como el jabalí son reservorios de *S. suis*, sin embargo, los resultados de nuestra investigación sugieren que las poblaciones silvestres estudiadas no representarían un riesgo potencial para la cabaña ganadera porcina o inclusive para el hombre.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)



Short communication

### Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates from wild rabbits



V. Sánchez del Rey<sup>a</sup>, J.F. Fernández-Garayzábal<sup>a,b</sup>, V. Briones<sup>a,b</sup>,  
A. Iriso<sup>c</sup>, L. Domínguez<sup>a</sup>, M. Gottschalk<sup>d</sup>, A.I. Vela<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Dirección General de Ordenación e Inspección de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St.-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 14 February 2013

Received in revised form 25 April 2013

Accepted 29 April 2013

##### Keywords:

Wild rabbit

*Streptococcus suis*

Molecular characterization

#### ABSTRACT

This work aims to investigate the presence of *Streptococcus suis* in wild rabbits. A total of 65 *S. suis* isolates were recovered from 33.3% of the wild rabbits examined. Most isolates (86.2%) belong to genotype *cps9*. These isolates were further characterized by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and virulence genotyping. Overall, *S. suis* exhibited a low genetic diversity. Only 5 genetic profiles were obtained by PFGE and most isolates (71.4%) were included in two pulsotypes that were also widely distributed among the wild rabbit population. MLST analysis assigned all *cps9* isolates into three new singletons (ST216, ST217 and ST284), which were not genetically related to the European ST87 and Spanish ST61 widespread swine clones, indicating a different genetic background for the *S. suis* isolates from wild rabbits and pigs. Wild rabbit isolates exhibited the genotype *mvp*+/epf+/sly+, different from those showed by most of the swine *S. suis* isolates of the ST87 and ST61 clones. None of the *S. suis* isolated from wild rabbits exhibited the genotype *cps2/mvp+/epf+/sly+* associated with human infections. These results indicate that *S. suis* isolates from wild rabbits are not genetically related with prevalent clones usually associated with infections in pigs or humans in Europe and do not exhibit either their virulence genotypes. Therefore, although wild rabbits could represent an unknown reservoir of this pathogen, they could not represent a potential risk for pigs or humans.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

*Streptococcus suis* is one of the most important swine pathogens in modern swine production. In pigs, the most important clinical feature associated with *S. suis* is meningitis. However, other disorders, such as arthritis, endocarditis, pneumonia, and septicemia have also been

described (Gottschalk et al., 2007). Furthermore *S. suis* has been isolated from a range of other mammalian and avian. This pathogen is also an important zoonotic agent in people in close contact with pigs or pork-derived products (Gottschalk et al., 2007). Wild animals can be reservoir of relevant pathogens for livestock and humans and several emerging infectious diseases, including zoonoses, were shown to originate from wildlife (Gortázar et al., 2007). Despite this, the epidemiological role of wild animals as reservoir of pathogens and their implication in the transmission of infectious diseases usually remains unclear (Martin et al., 2011). It is known that wild boars carry potentially virulent strains of *S. suis* (Baums et al.,

\* Corresponding author at: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.  
Tel.: +34 913943709; fax: +34 913943795.  
E-mail address: [avela@vet.ucm.es](mailto:avela@vet.ucm.es) (A.I. Vela).

2006). Serious *S. suis* infections in hunters have been described (Halaby et al., 2000; Baums et al., 2006). However, knowledge of the epidemiological distribution of *S. suis* in other wild species, such as rabbits, is very limited. Wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) have a relevant ecological and economic importance in the Mediterranean area as they generate an economically important hunting activity and sustain a large number of predator species, contributing to preserve the Mediterranean ecosystem diversity (Delibes-Mateos et al., 2008; Gálvez et al., 2009). They also play an important role as reservoir of relevant animal and human pathogens (Cutler et al., 2010; Maio et al., 2011).

Thus, the aim of this work was to investigate the presence of *S. suis* in wild rabbits and further characterize isolates by serotype, virulence-associated gene, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence (MLST) typing. This study could provide new data and information about the possible role of wild rabbits as reservoir of potentially virulent strains of *S. suis*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples, isolation and identification of *S. suis*

Nasal or tonsil swab samples from 78 wild rabbits were collected, transported under refrigeration to the laboratory and processed for bacteriological analysis within 48 h after animals were hunted. Rabbits were located in the forest of El Pardo in Valdaracete (Madrid, Central Region of Spain). Samples were cultured on Columbia-CNA agar plates that were incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions. From each sample, a maximum of six colonies suspected for *S. suis* (on the basis of colony morphology and alpha-hemolysis) were subcultured on blood agar. Gram positive, catalase-negative and alpha-hemolytic cocci were identified by the Rapid ID 32 STREP system (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions. Presumptive biochemical identification was further confirmed by PCR (Okwumabua et al., 2003).

### 2.2. Identification of capsular types and serotyping

Identification of capsular types 1 and 14, 1/2 and 2, 7 and 9 was determined by a multiplex PCR as described previously (Silva et al., 2006). All strains negative to these capsular types were serotyped by coagglutination as described previously (Gottschalk et al., 1993). Nontypable strains were then examined for the presence of capsule by cell surface hydrophobicity which was performed according to the protocol described by Rosenberg et al. (1980).

### 2.3. Virulence factors

Detection of the virulence associated genes for capsular polysaccharide (*cps*), muramidase released protein (*mvp*), extracellular protein factor (*epf*), suilysin (*sly*), surface antigen protein (*sao*), enolase (*eno*), orphan response regulator (*CovR*), di-peptidyl peptidase IV (*dpp*), inosine 5-monophosphate dehydrogenase (*impdh*), transpeptidase mediating covalent linkage of surface proteins to

peptidoglycan (*sortA*) and D-alanine-D-alanyl ligase (*dltA*) was performed by PCR as described previously (Silva et al., 2006; Feng et al., 2007, 2009; Fittipaldi et al., 2008; Ge et al., 2009; Pan et al., 2009; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2009) except that the forward and reverse primers used for amplification of the *dltA* gene were 5'-TCCGACGCTTGCCCTTGGTG-3' and: 5'-GAACAGCCACCG-CAGCCTCA-3', respectively. Differentiation of *mvp* and *epf* variants was carried out by multiplex PCR assays as described previously (Silva et al., 2006).

### 2.4. PFGE typing and multilocus sequence typing (MLST)

Genetic diversity of *S. suis* isolates was performed by PFGE after DNA digestion with the restriction enzyme *Bsp*120I (Vela et al., 2003). Similarities between restriction endonuclease digestion profiles were analyzed by using BioNumerics software (Applied Maths, BVBA, Belgium). Genetic diversity (GD) was calculated as the ratio of total number of PFGE patterns to total number of isolates (Martinez et al., 2002).

Primers and PCR conditions for MLST analysis were based on the *S. suis* MLST database website (<http://ssuis.mlst.net>). MLST alleles and resulting STs were assigned through submission of the respective allelic profiles to the *S. suis* MLST database. Analysis of the MLST complexes was performed with eBURST algorithm (Feil et al., 2004; <http://www.mlst.net>).

### 2.5. Statistical analysis

The chi-square test was used to analyze the relationship between *S. suis* MLST sequence types and virulence genotypes using the WinPepi program [version 11.25 (<http://www.epi-perspectives.com/content/8/1/1>)]. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

A total of 65 *S. suis* isolates were recovered from 33.3% of the wild rabbits tested, yielding the expected amplification PCR product of 688 bp. More than one isolate were obtained from the 57.7% of wild rabbits carrying *S. suis*. Most *S. suis* isolates belong to genotype *cps9* (86.2%), one isolate belong to serotype 31 (1.5%) and 8 isolates (12.3%) were not assigned to any capsular type by coagglutination test. The latest isolates presented hydrophobicity values higher than 70%, indicating that they are probably non-encapsulated (Gottschalk et al., 2013). Neither of *S. suis* isolates from wild rabbits belonged to the genotypes *cps1*, *cps2*, or *cps7*. The 56 *cps9* *S. suis* isolates displayed five different DNA fragment profiles after PFGE analysis and most isolates (71.4%) were included in two pulsotypes that were recovered from 68.2% of the wild rabbits positive to *cps9* *S. suis*. These results indicate a low degree of genetic diversity (GD 0.09) among the *cps9* isolates of *S. suis* as well as a great distribution within the population of rabbits tested. In those rabbits from which more than one *cps9* isolate of *S. suis* were obtained (46.2%), all exhibited identical genetic profile (data not shown). This low genetic diversity was also observed by MLST analysis. The *cps9* *S.*



**Table 1**  
PFGE, ST and virulence genotype profiles of the *cps9* *S. suis* isolates from wild rabbits.

ST (n° isolates)	ST profile <sup>a</sup>							PFGE profile (n° isolates)	Virulence genotype (n° isolates)
	<i>aroA</i>	<i>cpn60</i>	<i>dpr</i>	<i>gki</i>	<i>mutS</i>	<i>recA</i>	<i>thrA</i>		
216 (40)	25	97	64	94	7	64	71	3 (13)	<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> / <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (1)
								4 (27)	<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> / <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (12)
									<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> / <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> / <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (12)
									<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> –/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (15)
217 (8)	75	98	65	90	92	77	72	2 (7)	<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> –/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (6)
								5 (1)	<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> –/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (1)
									<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> +/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (1)
									<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> +/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (1)
284 (8)	105	116	21	114	122	95	89	1 (8)	<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> –/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> –/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> – (5)
								1 (8)	<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> +/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> –/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> + (1)
									<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> –/ <i>impdh</i> +/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> + (1)
									<i>mrp</i> –/ <i>epf</i> –/ <i>sly</i> –/ <i>sao</i> +/ <i>impdh</i> +/ <i>covR</i> +/ <i>sortA</i> +/ <i>dpp</i> +/ <i>eno</i> +/ <i>dtlA</i> + (1)

<sup>a</sup> All alleles described in this work, except alleles 25, 7 and 21, are new. The GenBank accession numbers for novel alleles included into ST216, ST217 and ST284 are HF912400–HF912404, HF912393–HF912399 and HF912387–HF912392, respectively.

*suis* isolates were assigned to three novel singletons: ST216 (included the 71.4% of the isolates), ST217 and ST284 that represented the 14.2% of the isolates/each (Table 1). The 56 *cps9* isolates of *S. suis* were classified into 6 genotypes according to their virulence associated genes profiles (Table 1). There was a statistical significant association ( $P < 0.05$ ) between virulence genotype *mrp*–/*epf*–/*sly*–/*sao*–/*impdh*/*covR*+/*sortA*+/*dpp*+/*eno*+/*dtlA*– and ST216 (Table 1) which included 96.4% of isolates within this genotype.

#### 4. Discussion

Most studies about *S. suis* typing have included basically swine and human isolates (Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Wei et al., 2009; Gottschalk et al., 2013) but little information is available regarding *S. suis* isolates from wild animals despite they can play an important role as carriers of potentially virulent isolates of *S. suis* as already demonstrated in wild boars (Baums et al., 2006). In the present study, we investigated the presence of *S. suis* in wild rabbits due to the relevant ecological and economic importance of these animals in many Mediterranean countries and their role as reservoir of important animal and human pathogens (Cutler et al., 2010; Maio et al., 2011). One third of wild rabbits examined in this study were colonized by *S. suis*. This percentage is significantly high considering that rabbit is an animal species far from pigs. Especially interesting was the high proportion of isolates of genotype *cps9* (86.2%) considering that this serotype has emerged as responsible of infections in pigs in Spain (Blume et al., 2009) and it is also prevalent in other European countries (Wisselink et al., 2000). For these reasons, only *cps9* isolates were further genotyped. The *cps9* isolates were genetically homogeneous as deduced from the limited genetic diversity observed by PFGE with only 5 pulsotypes (Table 1). This result was unexpected considering the relatively high degree of genetic heterogeneity reported for this pathogen (Vela et al., 2003; Blume et al., 2009). This low genetic diversity of the *cps9* *S. suis* isolates and the existence of high prevalent pulsotypes (Table 1) among wild rabbits may be related with the fact that these animals were collected from a relatively small geographic area or because these *cps9* isolates could

represent clones restricted to the wild rabbit population examined. Specific host adapted clones have been observed in other pathogens (Sørensen et al., 2010; Chrastek et al., 2012). Different *S. suis* genotypes are usually isolated from tonsils of the same pig (Wisselink et al., 2002). However, different *S. suis* isolates from tonsils of the same rabbit exhibited always identical pulsotype which would be in agreement with the idea of host-adapted clones. Further studies including wild rabbits from different geographical areas will be necessary to confirm or refute the hypothesis.

The low genetic diversity of the *cps9* isolates was also supported by MLST analysis. Isolates were assigned to three new allelic profiles (ST216, ST217 and ST284; Table 1). ST216 was the most prevalent (71.4% of the isolates) and it was also widely distributed among wild rabbits, being isolated from 68.2% of *cps9* positive. Most swine isolates in Europe belong to the ST87 complex (Rehm et al., 2007) and in Spain, *cps9* isolates belong to the ST61 complex (Blume et al., 2009). STs detected in wild rabbits were new singletons not genetically related with the STs usually associated with infections in pigs, indicating a different genetic background for the *S. suis* isolates from wild rabbits and pigs. Virulence genotypes among the *cps9* isolates supported also the low genetic diversity observed by PFGE and MLST analyses with only 6 different genotypes (Table 1). Considering only the classical virulence associated genes (*mrp*, *epf* and *sly* and their variants), the genotype of the *S. suis* isolates from wild rabbits was different from those exhibited by the swine *S. suis* isolates of the ST87 and ST61 clones. All *cps9* isolates from wild rabbits showed the genotype *mrp*–/*epf*–/*sly*– (Table 1), while the most common genotypes among *cps9* isolates of *S. suis* from pigs in Europe and Spain are *mrp*+/*epf*–/*sly*+ and *mrp*–/*epf*–/*sly*+ (Wisselink et al., 2000; Silva et al., 2006; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009). These results support the different genetic background of swine and wild rabbit isolates observed by MLST. Unlike wild boards that carry *S. suis* isolates with the genotype *cps2*/*mrp*+/*epf*+/*sly*+ typically associated with human infections and are therefore potentially zoonotic (Baums et al., 2006), none of the *S. suis* isolated from wild rabbits exhibited this genotype and therefore they would not represent a health risk for humans.

The present study describes for the first time the isolation of *S. suis* from wild rabbits. However, further characterization of these isolates indicates that they are genetically unrelated with the prevalent clones usually associated with infections in pigs in Europe and do not show either the virulence genotypes generally exhibited by these swine pathogenic clones. Therefore, although wild rabbits represent an atypical reservoir of this pathogen, they might not represent a potential risk for pigs or humans within the global epidemiology of this pathogen. Further studies concerning its genetic diversity are needed for better understanding of the population structure of *S. suis* in wild rabbits.

### Acknowledgements

This work was funded by the project AGL2009-14303-C02-01 of the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). Verónica Sánchez is the recipient of a PhD Grant from the Spanish MEC. The authors thank Hunting Federation of Madrid (Spain) for technical assistance.

### References

- Baums, C.G., Verkhuken, G.J., Rehm, T., Silva, L.M., Beyerbach, M., Pohlmeier, K., Valentin-Weigand, P., 2006. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 711–717.
- Blume, V., Luque, I., Vela, A.I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., Fernández-Garayzabal, J.F., 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *Int. Microbiol.* 12, 161–166.
- Chrzastek, K., Kuczkowski, M., Wieliczko, A.K., Bednarek, K.J., Wieliczko, A., 2012. Molecular epidemiologic investigation of Polish avian *Pasteurella multocida* strains isolated from fowl cholera outbreaks showing restricted geographical and host-specific distribution. *Avian Dis.* 56, 529–536.
- Cutler, S.J., Fooks, A.R., van der Poel, W.H., 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1–7.
- Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P., Villafuerte, R., 2008. The key role of European rabbits in the conservation of the western Mediterranean basin hotspot. *Conserv. Biol.* 22, 1106–1117.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 186, 1518–1530.
- Feng, Y., Zheng, F., Pan, X., Sun, W., Wang, C., Dong, Y., Ju, A.P., Ge, J., Liu, D., Liu, C., Yan, J., Tang, J., Gao, G.F., 2007. Existence and characterization of allelic variants of *Sao*, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 80–88.
- Feng, Y., Pan, X., Sun, W., Wang, C., Zhang, H., Li, X., Ma, Y., Shao, Z., Ge, J., Zheng, F., Gao, G.F., Tang, J., 2009. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *J. Infect. Dis.* 200, 1583–1592.
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., de la Cruz Domínguez-Punaro, M., Von Aulock, S., Draing, C., Marois, C., Kobisch, M., Gottschalk, M., 2008.  $\alpha$ -Alaninylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 76, 3587–3594.
- Gálvez, L., Bellure, J., Rebollo, S., 2009. European rabbits as ecosystem engineers: warrens increase lizard density and diversity. *Biodivers. Conserv.* 18, 869–885.
- Ge, J., Feng, Y., Ji, H., Zhang, H., Zheng, F., Wang, C., Yin, Z., Pan, X., Tang, J., 2009. Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome. *Curr. Microbiol.* 59, 248–255.
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., Vicente, J., 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 241–256.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Boudreau, M., 1993. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2192–2194.
- Gottschalk, M., Segura, M., Xu, J., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 29–45.
- Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., Grenier, D., 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Québec, Canada. *Vet. Microbiol.* 162, 819–825.
- Halaby, T., Hoitsma, E., Hupperts, R., Spanjaard, L., Luijck, M., Jacobs, J., 2000. *Streptococcus suis* meningitis: a poacher's risk. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 943–945.
- Maio, E., Carta, T., Balseiro, A., Sevilla, I.A., Romano, A., Ortiz, J.A., Vieira-Pinto, M., Garrido, J.M., de la Lastra, J.M., Gortázar, C., 2011. Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Res. Vet. Sci.* 91, 212–218.
- Martin, C., Pastoret, P.P., Brochier, B., Humblet, M.F., Saegerman, C., 2011. A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe. *BMC Vet. Res.* 42, 70, <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-42-70>.
- Martinez, G., Harel, J., Lacouture, S., Gottschalk, M., 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Can. J. Vet. Res.* 66, 240–248.
- Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E., 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 79–84.
- Pan, X., Ge, J., Li, M., Wu, B., Wang, C., Wang, J., Feng, Y., Yin, Z., Zheng, F., Cheng, G., Sun, W., Ji, H., Hu, D., Shi, P., Feng, X., Hao, X., Dong, R., Hu, F., Tang, J., 2009. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *J. Bacteriol.* 191, 2601–2612.
- Rehm, T., Baums, C.G., Strommenger, B., Beyerbach, M., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2007. Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlate with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *J. Appl. Microbiol.* 56, 102–109.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33.
- Silva, L.M., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentin-Weigand, P., 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* 115, 117–127.
- Sørensen, U.B., Poulsen, K., Ghezzi, C., Margarit, I., Kilian, M., 2010. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *mBio* 1, e00178–e210, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00178-210>.
- Vela, A.I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M.A., Borge, C., Perea, J.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzabal, J.F., 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2498–2502.
- Wang, C., Li, M., Feng, Y., Zheng, F., Dong, Y., Pan, X., Cheng, G., Dong, R., Hu, D., Feng, X., Ge, J., Liu, D., Wang, J., Cao, M., Hu, F., Tang, J., 2009. The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch. Microbiol.* 191, 23–33.
- Wei, Z., Li, R., Zhang, A., He, H., Hua, Y., Xia, J., Cai, X., Chen, H., Jin, M., 2009. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet. Microbiol.* 137, 196–201.
- Wisselink, H.J., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., Vecht, U., 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet. Microbiol.* 74, 237–248.
- Wisselink, H.J., Joosten, J.J., Smith, H.E., 2002. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2922–2929.
- Zhang, X.H., He, K.W., Duan, Z.T., Zhou, J.M., Yu, Z.Y., Ni, Y.X., Lu, C.P., 2009. Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2. *Microb. Pathog.* 47, 267–273.





Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)



Short Communication

# Characterisation of *Streptococcus suis* isolates from wild boars (*Sus scrofa*)



Verónica Sánchez del Rey<sup>a</sup>, José F. Fernández-Garayzábal<sup>a,b</sup>, Gregorio Mentaberre<sup>c</sup>, Víctor Briones<sup>d</sup>, Santiago Lavín<sup>c</sup>, Lucas Domínguez<sup>a</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>e</sup>, Ana Isabel Vela<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFAS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

<sup>d</sup> Centro de Investigación en Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Ministerio de Economía y Competitividad, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

<sup>e</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St.-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2

## ARTICLE INFO

### Article history:

Accepted 13 March 2014

### Keywords:

Wild boar  
*Streptococcus suis*  
Serotyping  
Molecular characterisation

## ABSTRACT

Wild boar are widely distributed throughout the Iberian Peninsula and can carry potentially virulent strains of *Streptococcus suis*. The objective of this study was to determine the prevalence of *S. suis* in wild boars from two large geographical regions of Spain. Serotypes 1, 2, 7 and 9 identified were further genetically characterised by virulence-associated genotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) to determine the population structure of *S. suis* carried by these animals. *Streptococcus suis* was isolated from 39.1% of the wild boars examined: serotype 9 was the most frequently isolated (12.5%), followed by serotype 1 (2.5%). Serotype 2 was rarely isolated (0.3%). Eighteen additional serotypes were identified indicating wide diversity of this pathogen within the wild boar population. This heterogeneity was confirmed by PFGE and MLST analyses and the majority of isolates exhibited the virulence-associated genotype *mmp-epf-sly*-. The results of this study highlight that the carriage of *S. suis* by wild boars is commonplace. However, MLST data indicate that these isolates are not related to prevalent clonal complexes ST1, ST16, ST61 and ST87 typically associated with infection of pigs or humans in Europe.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Streptococcus suis* is an important pathogen of pigs worldwide (Higgins and Gottschalk, 1999), and is associated with sporadic infections in other mammalian and avian species (Cruz Colque et al., 1993; Salas et al., 1994; Gottschalk et al., 2007) including humans (Gottschalk et al., 2007). Wild boar (*Sus scrofa*) populations have grown in many European countries over recent decades (Saez-Royuela and Telleria, 1986; Artois et al., 2002) increasing the risk of transmission of the shared pathogen *S. suis* to domestic pigs farmed outdoors (Albina et al., 2000). Furthermore, Baums et al. (2007) found that wild boar carry potentially zoonotic strains of *S. suis*, and several cases of *S. suis* infection in hunters have been reported (Halaby et al., 2000; Rosenkranz et al., 2003; Baums et al., 2007). The objective of the present study was to determine the prevalence of *S. suis* in wild boars of two large geographical regions of

Spain where the boar population is dense, and to genetically characterise the isolates to enhance our understanding of the population structure of this pathogen.

Samples of tonsil ( $n = 379$ ), nasal cavity ( $n = 173$ ) or lung ( $n = 275$ ) were collected from 425 hunted wild boars between 2007 and 2010: 254 and 171 animals from North-east and Central regions of Spain, respectively. Samples were cultured on Columbia-CNA agar (37 °C for 24–48 h under aerobic conditions). A maximum of six colonies/sample with a presumptive identification of *S. suis* based on colony morphology,  $\alpha$ -haemolytic activity, Gram positive staining and absence of catalase activity were subcultured onto blood agar and identified by the Rapid ID 32 STREP system (BioMérieux) and PCR (Okwumabua et al., 2003). Serotypes 1 (and 14), 2 (and 1/2), 7 and 9 were screened by multiplex PCR (Silva et al., 2006). All strains negative for these capsular types were serotyped by co-agglutination (Gottschalk et al., 1993). Non-typeable strains were examined for the presence of capsule by cell surface hydrophobicity (Rosenberg et al., 1980).

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943709.

E-mail address: [avela@vet.ucm.es](mailto:avela@vet.ucm.es) (A.I. Vela).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.013>

1090-0233/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Table 1**  
Serotype distribution of *Streptococcus suis* isolates recovered from wild boar.

Serotype	Number of isolates (%)	Number of <i>S. suis</i> -positive boar with this serotype (%)
1	8 (2.5)	3 (1.8)
2	1 (0.3)	1 (0.6)
7	3 (0.9)	3 (1.8)
9	40 (12.5)	33 (20.0)
16	13 (4.1)	13 (7.8)
31	18 (5.6)	12 (7.2)
1/27 <sup>a</sup>	22 (6.9)	14 (8.4)
9/22/27/31 <sup>a</sup>	19 (5.9)	15 (9.0)
Others <sup>b</sup>	49 (15.3)	44 (26.5)
Other double or triple serotypes <sup>c</sup>	64 (20.0)	51 (30.7)
Non-typeable <sup>d</sup>	83 (25.9)	63 (38.0)

<sup>a</sup> Serotyping repeated three times. Confirmed as *S. suis* by PCR (Okumabua et al., 2003).

<sup>b</sup> Includes serotypes 1/2, 3, 4, 5, 6, 8, 15, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 29, 33 and 34.

<sup>c</sup> Isolates, other than serotype 1/2, reacting with antisera against two or three different serotypes.

<sup>d</sup> Forty-four isolates with hydrophobicity values >70%, indicating they are probably non-encapsulated (Gottschalk et al., 2013). Thirty-nine isolates did not agglutinate with any antisera directed against the 35 serotypes.

Strains of serotypes 1, 2, 7 and 9 were further investigated for virulence-associated factors using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) (Sánchez del Rey et al., 2013). To identify groups of related serotypes, the isolates from this study were grouped with all of the isolates present in the *S. suis* database using the eBURST algorithm<sup>1</sup> and software provided by the MLST website. Genetic diversity (GD) was calculated as the ratio of total number of PFGE patterns to the total number of isolates (Martínez et al., 2002).

A total of 320 *S. suis* isolates were recovered from 39.1% of the wild boars examined. Carriage rates of *S. suis* were 43.7% and 32.2% in the North-eastern and Central regions, respectively. This detection rate (approximately 40%) confirms that the carriage of *S. suis* by wild boars in Spain is common, and emphasises the role of this species as a potentially important reservoir of this pathogen. While tonsils are typically sampled when investigating the presence of *S. suis* in carrier animals (Martínez et al., 2002; Baums et al., 2007; Wang et al., 2013), the nasal cavities have also been targeted (Brisebois et al., 1990). In the current study, *S. suis* was detected in 86.1% of wild boar tonsil samples, while only 9.6% of animals cultured positive from the samples taken from their nasal cavities, a finding that clearly highlights the greater sensitivity of tonsillar site in detecting *S. suis*.

Serotypes 1, 2, 7 or 9 represented the 16.2% of the isolates identified (Table 1). Isolates of serotype 9 were the most frequently found ( $n=40$ ; 12.5%) and were recovered from 20% of *S. suis*-positive wild boars. This serotype was also the most frequently found in Germany (Baums et al., 2007), and is one of the most prevalent of the isolates of *S. suis* circulating in pigs in Spain (Vela et al., 2003; Blume et al., 2009). Unlike the findings from wild boars in Germany (Baums et al., 2007), isolates of serotypes 2 and 7 were rarely detected (Table 1). Almost 84% of isolates could not be typed by multiplex PCR (Silva et al., 2006), results similar to those of Baums et al. (2007). As these large percentages of non-typeable isolates limit our appreciation of the diversity of the *S. suis* population in this species, all non-typeable isolates were serotyped by co-agglutination, at which point 18 additional serotypes were identified (Table 1).

This result suggests that there is a wide diversity in the *S. suis* population in wild boar in Spain. Almost 26% of strains ( $n=83$ ) could not be serotyped, and, of these, 44 (13.8%) had hydrophobicity values

>70%, indicating they are probably poorly or non-capsulated (Gottschalk et al., 2013). A total of 39 isolates (12.1%) did not agglutinate with any of the 35 typing antisera. In agreement with the results of previous studies (Hampson et al., 1993; Hoa et al., 2011), a high percentage of isolates reacted repeatedly with more than one serotype (Table 1).

Although serotype 2 is considered the most prevalent serotype associated with disease in pigs and humans, serotypes 1, 7 and 9 have also been implicated, and are highly prevalent in Europe (Smith et al., 1999; Wisselink et al., 2000; Blume et al., 2009). Thus, we further categorised isolates of these serotypes ( $n=52$ ) according to the virulence-associated genotype, PFGE and MLST. By PFGE, isolates of serotypes 1, 2, 7 and 9 displayed 47 different pulsotypes (Fig. 1), with most isolates represented by unique pulsotypes. This reflects great genetic diversity (GD 0.94), a finding in line with the fact that *S. suis* isolates were collected from a large number of wild boars, over different years and in two geographical regions. This finding also agrees with the diversity observed by serotyping (Table 1) and with the genomic variability previously reported in pig isolates (Vela et al., 2003; Blume et al., 2009; Luque et al., 2010). This genetic heterogeneity was also observed following MLST analysis with *S. suis* isolates assigned to 37 new STs (sequence types) (Fig. 1 and see Appendix S1, Supplementary material in the online version at doi:10.1016/j.tvjl.2014.03.013). Sequence types 214 and 360 were the most frequently detected (7.7% and 11.5%, respectively), while ST206, ST209, ST210, ST212, ST297 and ST396 were represented by two to three isolates, and the remaining STs (78.4%) were singletons.

Most isolates of the serotypes 1, 2, 7 and 9 (96.2%) exhibited the virulence-associated genotype *mrp-epf-sly-*, and only two genotypes *cps1/mrp-epf-sly+* and *cps9/mrp-epf-sly+*. The single isolate of serotype 2 identified in the current study did not exhibit either the high prevalence virulence-associated genotype *mrp-epf-sly+* found in porcine and human clinical isolates (Silva et al., 2006; Gottschalk et al., 2007; Blume et al., 2009), or the genotype *mrp-epf-sly+* found in most serotype 2 isolates in wild boars in Germany (Baums et al., 2007). None of the serotype 9 isolates belonged to genotypes *mrp-epf-sly+* or *mrp-epf-sly-* very commonly found in clinical isolates from pigs in Europe (Wisselink et al., 2000; Silva et al., 2006; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009).

Analysis of the allelic profiles of the STs detected in wild boars revealed that most did not share any allele with genotypes within the ST1, ST16, ST61 and ST87 complexes (see Appendix S1, Supplementary material in the online version at doi:10.1016/j.tvjl.2014.03.013) associated with clinical isolates of serotypes 2 and 9 from pigs in Spain and other European countries, or with human isolates of serotype 2 (King et al., 2002; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Schultz et al., 2012). Only ST278 and ST280 shared one allele (genes *thrA* and *recA*) with genotypes comprising the ST87 and ST61 complexes. Therefore, despite their prevalence in wild boars in Spain, strains of *S. suis* are genetically distantly related to the common clonal complexes associated with porcine or zoonotic infection in Europe (see Appendix S1, Supplementary material in the online version at doi:10.1016/j.tvjl.2014.03.013).

The findings of our study suggest that wild boar in Spain do not represent a health risk for pigs or humans, at least within the context of *S. suis* infection. The similar testing of wild boar populations in other regions of Europe is recommended to corroborate our findings and provide a broader overview of the epidemiology of this pathogen.

#### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

<sup>1</sup> See <http://eburst.mlst.net>.

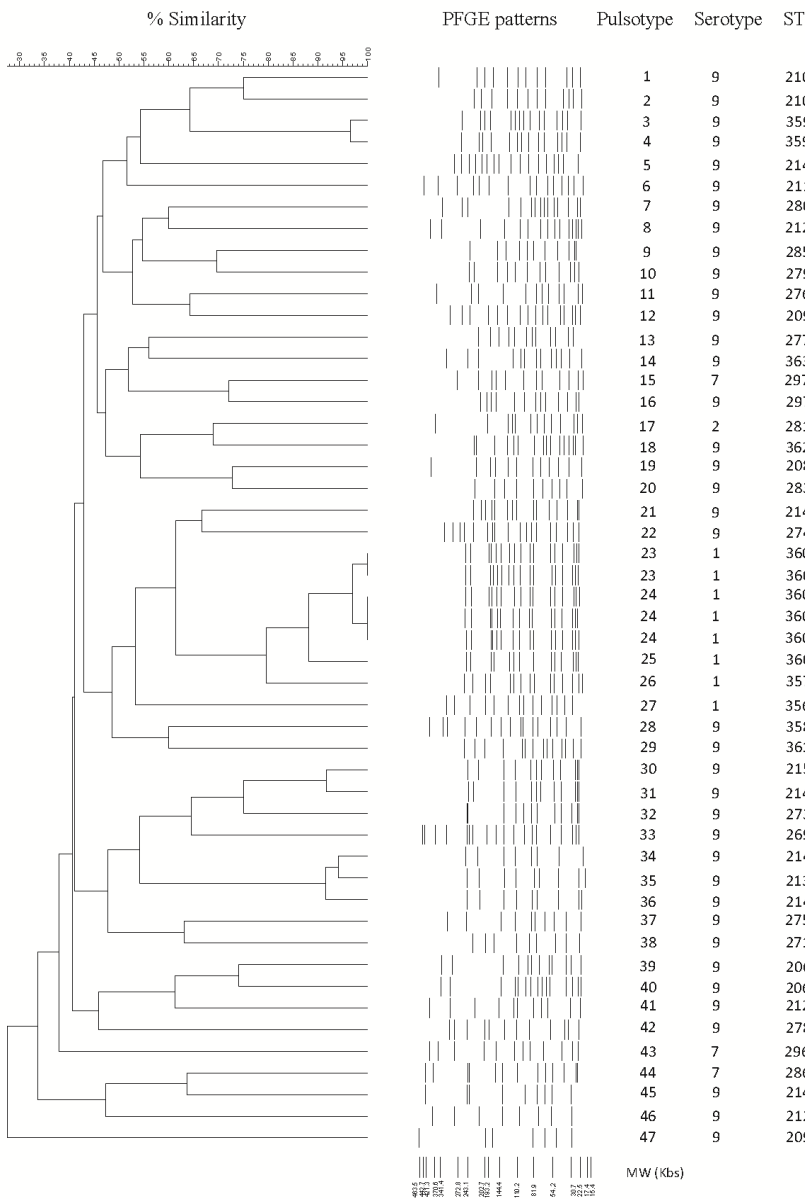


Fig. 1. Dendrogram illustrating the genetic relationship, based on unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis, of 50 *Streptococcus suis* isolates (serotypes 1, 2, 7 and 9) identified in wild boar (two isolates were not included in the analysis as DNA degradation resulted in a 'smear' pattern). The allelic profiles of novel serotypes, and the GenBank accession number of novel alleles given in Appendix S1 (Supplementary material in the online version at doi:10.1016/j.tvjl.2014.03.013).



## Acknowledgements

This work was funded by project AGL2009-14303-C02-01 of the Spanish Ministry of Science and Innovation. Ms. Verónica Sánchez is the recipient of a PhD Grant from the Spanish Ministry of Education and Science.

## Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.tvjl.2014.03.013.

## References

- Albina, E., Mesplede, A., Chenut, G., Le Potier, M.F., Bourbao, G., Le Gal, S., Leforban, Y., 2000. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology* 77, 43–57.
- Artois, M., Depner, K.R., Guberti, V., Hars, J., Rossi, S., 2002. Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 21, 287–303.
- Baums, C.G., Verkuhlen, G.J., Rehm, T., Silva, L.M., Beyerbach, M., Pohlmeier, K., Valentin-Weigand, P., 2007. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boar of Northwestern Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 711–717.
- Blume, V., Luque, I., Vela, A.I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., Fernández-Garayzábal, J.F., 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *International Microbiology* 12, 161–166.
- Brisebois, L.M., Charlebois, R., Higgins, R., Nadeau, M., 1990. Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets. *Canadian Journal of Veterinary Research* 54, 174–177.
- Cruz Colque, J.I., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 1993. Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle. *Letters in Applied Microbiology* 16, 72–74.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Boudreau, M., 1993. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2192–2194.
- Gottschalk, M., Segura, M., Xu, J., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: The Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews* 8, 29–45.
- Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., Grenier, D., 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Québec, Canada. *Veterinary Microbiology* 162, 819–825.
- Halaby, T., Hoitsma, E., Hupperts, R., Spanjaard, L., Luijck, M., Jacobs, J., 2000. *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19, 943–945.
- Hampson, D.J., Trott, D.J., Clarke, L.L., Mwaniki, C.G., Robertson, L.D., 1993. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2895–2900.
- Higgins, R., Gottschalk, M., 1999. Streptococcal disease. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 563–578.
- Hoa, N.T., Chieu, T.T.B., Nga, T.T.T., Dung, N.V., Campbell, J., Anh, P.H., Tho, H.H., Chau, N.V.V., Bryant, J.E., Hien, T.T., et al., 2011. Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam. *PLoS ONE* 6, e17943.
- King, S.J., Leigh, A., Heath, P.J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C.G., Whatmore, A.M., 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones, and potential capsular serotype exchange. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3671–3680.
- Luque, I., Blume, V., Borge, C., Vela, A.I., Perea, J.A., Márquez, J.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Tarradas, C., 2010. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. *The Veterinary Journal* 186, 396–398.
- Martínez, G., Harel, J., Lacouture, S., Gottschalk, M., 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66, 240–248.
- Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E., 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* 218, 79–84.
- Rehm, T., Baums, C.G., Strommenger, B., Beyerbach, M., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2007. Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlate with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *Journal Applied Microbiology* 56, 102–109.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29–33.
- Rosenkranz, M., Elsner, H.A., Stürenburg, H.J., Weiller, C., Rötter, J., Sobottka, L., 2003. *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. *Journal of Neurology* 250, 869–870.
- Sánchez del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J.F., Briones, V., Iriso, A., Domínguez, L., Gottschalk, M., Vela, A.I., 2013. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates from wild rabbits. *Veterinary Microbiology* 165, 483–486.
- Saez, Royuela, C., Telleria, J.L., 1986. The increased population of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Europe. *Mammal Review* 16, 97–101.
- Salasia, S.I., Lämmle, C., Devriese, L.A., 1994. Serotypes and putative virulence markers of *Streptococcus suis* isolates from cats and dogs. *Research in Veterinary Science* 57, 259–261.
- Schultsz, C., Jansen, E., Keijzers, W., Rothkamp, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van der Ende, A., 2012. Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PLoS ONE* 7, e33854.
- Silva, L.M., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentin-Weigand, P., 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology* 115, 117–127.
- Smith, H.E., Veenbergen, V., van der Velde, J., Damman, M., Wisselink, H.J., Smits, M.A., 1999. The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: Development of rapid serotype-specific PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3146–3152.
- Vela, A.I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M.A., Borge, C., Perea, J.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2498–2502.
- Wang, K., Zhang, W., Li, X., Lu, C., Chen, J., Fan, W., Huang, B., 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from slaughter swine. *Current Microbiology* 66, 344–349.
- Wisselink, H.J., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., Vecht, U., 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary Microbiology* 74, 237–248.

## Appendix A Supplementary material

### Manuscript: Characterisation of *Streptococcus suis* isolates from wild boars (*Sus scrofa*)

V. Sánchez del Rey, J.F. Fernández-Garayzábal, G. Mentaberre, V. Briones, S. Lavín, L. Domínguez, M. Gottschalk, A.I. Vela

Supplementary Table 1.

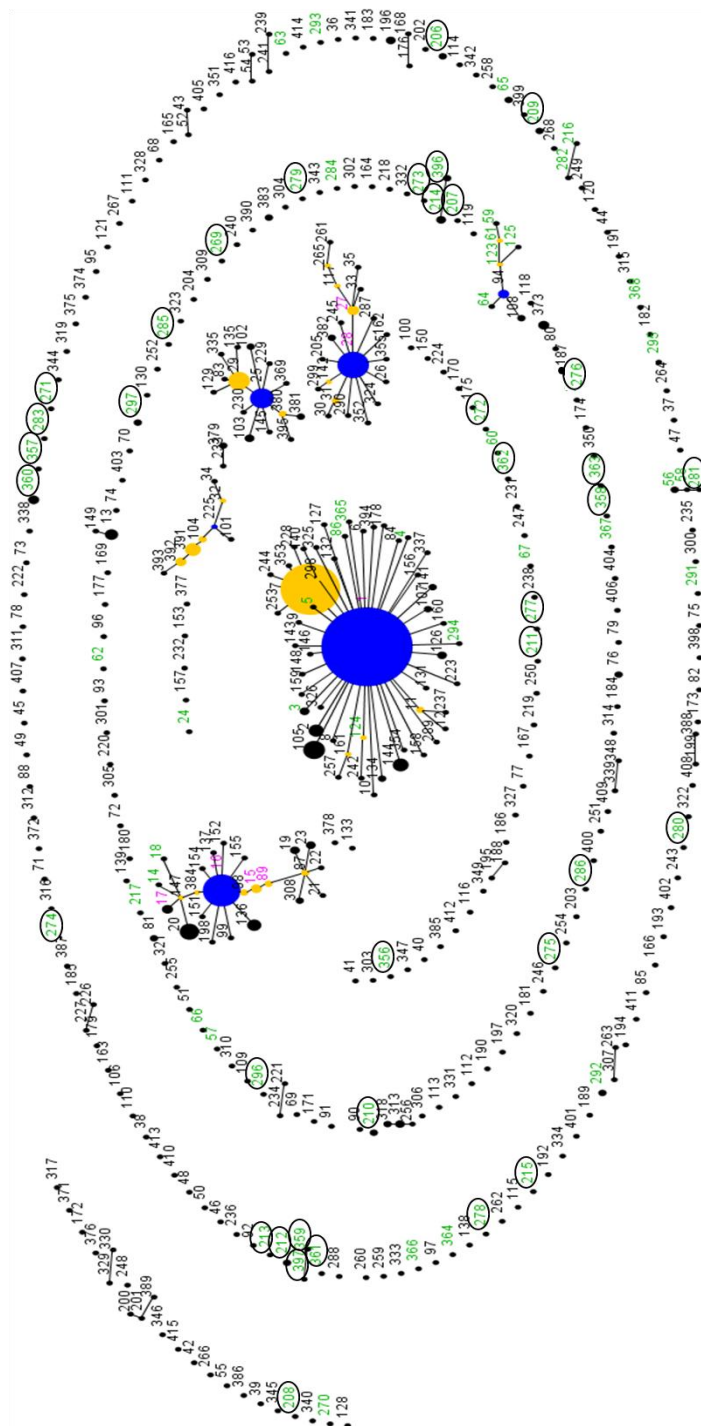
Allelic profiles of the STs detected in the present study with their respective GenBank accession numbers.

ST	Serotype	<i>aroA</i>	<i>cpm60</i>	<i>dpr</i>	<i>gki</i>	<i>mutS</i>	<i>recA</i>	<i>thrA</i>
206	9	68* (HF912702)	87* (HF912709)	61* (HF912719)	89* (HF912720)	16	72* (HF913585)	10
207	9	49	88* (HF912710)	2	90	16	72	66* (HF913590)
208	9	69* (HF912703)	89* (HF912711)	62* (HG000305)	39	88* (HF913581)	73* (HF913586)	67* (HF913591)
209	9	70* (HF912704)	90* (HF912712)	61	91* (HF913577)	89* (HF913582)	64	68* (HF913592)
210	9	71* (HF912705)	91* (HF912713)	63* (HF91272)	87* (HF913578)	4	64	18
211	9	72* (HF912706)	92* (HF912714)	2	92* (HF913579)	16	74* (HF913587)	11
212	9	70	93* (HF912715)	21	93* (HF913580)	90* (HF913583)	75* (HF913588)	69* (HF913593)
213	9	73* (HF912707)	94* (HF912716)	21	93	90	75	69
214	9	49	95* (HF912717)	2	87	16	72	66
215	9	74* (HF912708)	96* (HF912718)	63	39	91* (HF913584)	76* (HF913589)	70* (HF913594)
269	9	69	116* (HF912660)	77* (HF912671)	110* (HF912681)	16	26	8
271	9	98* (HF912405)	118* (HF912661)	79* (HF912672)	39	116* (HF912688)	77	18
272	9	99* (HF912406)	119* (HF912662)	80* (HF912673)	112* (HF912682)	4	95	86* (HF912699)
273	9	49	95	2	89	90	72	66
274	9	100* (HF912407)	120* (HF912663)	81* (HF912674)	113* (HF912684)	117* (HF912689)	96* (HF912695)	87* (HF912700)

275	9	74	121* (HF912664)	82* (HF912675)	39	16	76	70
276	9	25	122* (HF912665)	20	114	16	26	88* (HF912701)
277	9	101* (HF912408)	123* (HF912666)	83* (HF912676)	115* (HF912685)	118* (HF912690)	97* (HF912696)	51
278	9	43	124* (HF912699)	84* (HF912679)	116	119* (HF912692)	98* (HF912697)	4
279	9	102* (HF912409)	118	85* (HF912680)	117* (HF912687)	120* (HF912693)	99* (HF912698)	8
280	9	103* (HF912410)	124	61	94	121* (HF912694)	22	11
281	2	104* (HF912411)	2	17	37	29	21	15
283	9	98	118	2	118* (HF912683)	116	77	18
285	9	74	125* (HF912667)	86* (HF912677)	116* (HF912686)	123* (HF912691)	76	70
286	7	43	126* (HF912668)	87* (HF912678)	39	21	98	70
296	7	109* (HF913595)	129* (HF913597)	61	89	16	26	88
297	7,9	110* (HF913596)	130* (HF913598)	93* (HF913599)	39	127* (HF913600)	76	91* (HF913602)
356	1	131* (HG001248)	156* (HG001254)	115* (HG001256)	115	150* (HG001258)	96	104* (HG001259)
357	1	132* (HG001249)	156	115	115	118	96	61
358	9	131	130	116* (HG001257)	39	123	26	70
359	9	74	157* (HG001255)	86	39	125	76	105* (HG001260)
360	1	101	156	83	115	118	96	61
361	9	74	157	86	39	91	76	106* (HG001261)
362	9	133* (HG001250)	130	63	39	91	76	106
363	9	134* (HG001251)	130	116	39	4	26	70
396	9	49	95	2	1	16	72	66
397	9	74	157	86	39	123	76	105

\*Novel allele identified in this study (GenBank accession number).

Supplementary Fig. eBURST analysis of *Streptococcus suis* isolates from wild boars surveyed and the entire *S. suis* MLST database (accessed on 27 November 2013). Circled STs correspond to wild boar isolates detected in this study. Green numbers represent sequence types (STs) only detected in Spain, while pink numbers represent those found in both Spain and other countries.





## Capítulo III.II

### Tipificación molecular de aislados de *S. suis* procedentes de cerdo ibérico. Comparación con aislados de cerdo blanco criado en intensivo

---



La mayoría de los estudios realizados en aislados de *S. suis* procedentes de ganado porcino han sido focalizados en el cerdo blanco de producción intensiva (Wisselink y col., 2000; Vela y col., 2003; Rehm y col., 2007; Blume y col., 2009), sin embargo, no se dispone de información relativa a la distribución y características moleculares de la población de *S. suis* presente en los sistemas de producción porcina extensiva, como puede ser el cerdo ibérico en nuestro país.

El cerdo ibérico es una raza española perfectamente adaptada al ecosistema mediterráneo. Los cerdos ibéricos denominados "de montanera", son criados en un sistema de explotación extensivo íntimamente ligado a la dehesa, en el cual se alimentan exclusivamente con bellotas y hierbas, además de compartir los recursos naturales con otros animales silvestres y domésticos. Esta producción es de gran importancia económica debido a la creciente demanda de sus productos cárnicos que presentan una elevada calidad, especialmente los curados como el jamón ibérico (Cava y col., 1997). En respuesta a la elevada demanda, la tendencia actual se dirige hacia la intensificación de las explotaciones de cerdo ibérico, de manera similar a la del cerdo blanco criado en intensivo.

Por otro lado, se ha descrito que la interacción con otros animales, así como las diferentes condiciones a las cuales son sometidos los animales en los diferentes sistemas de explotación, puede alterar la epidemiología de ciertos microorganismos (Mennerat y col., 2010). En consecuencia decidimos investigar la población de *S. suis*, presente tanto en cerdo ibérico criado en extensivo de montanera como criado en intensivo, mediante el uso de diversas técnicas de caracterización (serotipificación, detección de diversos genes asociados a la virulencia y las técnicas moleculares PFGE, MLST y MLVA), con el objetivo de incrementar la información sobre la distribución y las características de *S. suis* en los diferentes sistemas de producción. Asimismo, se realizó una comparación con aislados de *S. suis* procedentes de cerdo blanco de cría intensiva.

Los resultados mostraron un porcentaje elevado de cerdos ibéricos portadores de *S. suis*, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes sistemas de explotación. Por otro lado, la investigación molecular de los



aislados procedentes tanto de cerdo blanco como ibérico, mostraron la existencia de grandes similitudes entre ambas poblaciones, detectándose en la población de aislados clínicos de serotipo 2 y 9 de cerdo ibérico los mismos clones (ST123 y ST1) que aquellos presentes en el cerdo blanco de nuestro país (Blume y col., 2009).

## ARTICLE IN PRESS

The Veterinary Journal ■■ (2014) ■■ – ■■



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

## Molecular typing of *Streptococcus suis* isolates from Iberian pigs: A comparison with isolates from common intensively-reared commercial pig breeds

V. Sánchez del Rey <sup>a</sup>, J.F. Fernández-Garayzábal <sup>a,b</sup>, C. Bárcena <sup>a</sup>, V. Briones <sup>c</sup>,  
L. Domínguez <sup>a</sup>, M. Gottschalk <sup>d</sup>, A.I. Vela <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación en Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Ministerio de Economía y Competitividad, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St.-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada

## ARTICLE INFO

Article history:  
Accepted 11 October 2014

Keywords:  
Iberian pigs  
Molecular characterisation  
*Streptococcus suis*

## ABSTRACT

The Iberian pig (IP) is a traditional Spanish breed variety of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*) with high economic importance because of the value of the dry-cured products in national and international markets. The genetic characteristics of tonsillar and clinical *Streptococcus suis* isolates from the IP maintained under extensive or intensive management conditions were investigated. *S. suis* isolates from IP pigs were compared with *S. suis* isolates from intensively-farmed pigs of common breeds (CBP). *S. suis* was isolated from 48.4% of the IP tonsils examined, indicating wide distribution among IP pigs.

Serotypes 1 (9.4%), 2 (8.6%) and 9 (7%) were the most commonly found, although a high percentage of *S. suis* isolates were not typeable by coagglutination testing. No significant differences in carrier rates or serotype diversity were observed between management systems, indicating that intensive farming does not influence *S. suis* colonisation. Both pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable number tandem repeat analysis showed a serotype-based distribution of *S. suis* IP isolates. Serotypes 1 and 2 *S. suis* isolates were grouped in the same cluster, whereas isolates of serotypes 9 and 7 were assigned to another cluster. All clinical and most tonsillar serotype 2 IP isolates were assigned to sequence type 1 (ST1) and exhibited the virulence genotype *mrf+/epf+/sly+*, indicating a high distribution of this genetic lineage among IP as well as a population of serotype 2 common to IPs and CBPs. The only clinical isolate of serotype 9 from IP was assigned to ST123, a sequence type associated with clinical isolates in CBPs in Spain.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

## Introduction

*Streptococcus suis* is one of the most important pathogens in the swine industry worldwide, causing meningitis and a wide range of diseases such as arthritis, endocarditis, pneumonia and septicaemia (Gottschalk, 2012). *S. suis* has also been recognised as an emerging human pathogen over the past few years, affecting people in close contact with pigs or pork-derived products (Gottschalk et al., 2007).

Many studies have concentrated on intensively-farmed pigs of various common breeds (common breed pigs, CBPs) (Wisselink et al.,

2000; Vela et al., 2003; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Gottschalk et al., 2013). However, none of these studies focussed on pigs reared outdoors. The Iberian pig (IP) is a traditional Spanish breed variety of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*), and its production is highly adapted to the Mediterranean ecosystem. In traditional management systems, IPs are reared outdoor in sparse oak forests ('dehesa') where they feed exclusively on acorns and grass and share natural resources with other wild and domestic animals. This particular production system is referred to as 'montanera'. IPs are highly important economically because of the growing demand for their high quality meat products, especially dry-cured products (Cava et al., 1997). In response to this high demand, the IP is now also being produced indoors. This production system is termed 'cebo' and the pigs are primarily fed with commercial feed.

Different farming practices and interaction with other animals can alter the epidemiology of pathogenic microorganisms (Mennerat et al., 2010). In view of the differences in farming practices between

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943709.  
E-mail address: [avela@vet.ucm.es](mailto:avela@vet.ucm.es) (A.I. Vela).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvj.2014.10.020>  
1090-0233/© 2014 Published by Elsevier Ltd.

# ARTICLE IN PRESS

2

V.S. Rey et al./The Veterinary Journal ■■ (2014) ■■–■■

the IP and CBP breeds we decided to investigate the population of *S. suis* carried by the IP. Specifically, the aim of this study was to determine the *S. suis* carriage rates and serotypes in the IP, as well as the virulence factor profiles and genetic diversity of IP isolates and compare them with those from the CBP.

## Materials and methods

### *S. suis* isolates

A total of 128 *S. suis* isolates from slaughterhouse IP pigs were analysed in this study. Isolates were recovered from the tonsils of 182 finishing IPs collected at different slaughterhouses from 11 provinces in Spain and one province in Portugal in 2010 and 2011. Isolates were classified according to the production system used in their host as either 'montañera' (MIP;  $n = 111$ ) or 'cebo' (CIP;  $n = 71$ ). Another 15 *S. suis* clinical isolates were obtained from the same number of diseased CIP with pneumonia ( $n = 4$ ), meningitis ( $n = 5$ ), arthritis ( $n = 2$ ) and septicemia ( $n = 4$ ).

Tonsils from swine carcasses and clinical samples were removed aseptically and submitted to our laboratory in sterile containers under refrigeration for processing within 24 h of sampling. Samples were cultured on Columbia-CNA agar and incubated at 37 °C for 24–48 h under aerobic conditions. From each tonsillar sample, a maximum of six colonies presumptively considered as *S. suis* by colony morphology (small slightly mucoid grey–white colonies with  $\alpha$ -haemolysis) were subcultured on blood agar for further identification. A representative colony from each clinical sample was also identified.

Colonies of catalase negative, Gram positive cocci exhibiting  $\alpha$ -haemolysis were identified as *S. suis* by the Rapid ID 32 STREP system (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions. Biochemical identification was further confirmed based on the sequence of the gene encoding glutamate dehydrogenase (*gdh*) by polymerase chain reaction (PCR) (Okwumabua et al., 2003).

For comparison purposes, 50 *S. suis* isolates from CBPs available in the Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria culture collection were included in the study. These isolates, from pigs on farms located in different geographical areas of Spain, included 41 clinical isolates of serotype 2 ( $n = 15$ ) and serotype 9 ( $n = 26$ ) and nine tonsillar isolates of serotype 2.

### Identification of capsular types and serotyping

A multiplex PCR was used to identify capsular types 1 and 14, 1/2 and 2, 7 and 9 as described by Silva et al. (2006). All isolates that were negative for these capsular types were serotyped using a coagglutination test (Gottschalk et al., 1993). Non-typeable isolates were further examined for the presence of capsules using cell surface hydrophobicity (Rosenberg, 1980). Isolates were classified into those with low hydrophobicity (<30% isolates classified as capsulated) and high hydrophobicity (>70% isolates most probably not capsulated) (Gottschalk et al., 2013).

### Virulence factor profiling

The presence of genes encoding for the putative virulence associated factors muramidase released protein (*murP*), extracellular protein factor (*epf*) and sulyisin (*sls*) was determined for all strains belonging to serotypes 1, 2, 7 and 9 by a multiplex-PCR as described previously (Silva et al., 2006). Differentiation of *murP* and *epf* variants was carried out by monoplex PCR assays (Silva et al., 2006).

### Molecular typing

Only isolates of prevalent European serotypes 1, 2, 7 or 9 were further characterised by multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA).

### Multilocus sequence typing

MLST analysis was performed on seven housekeeping genes *aroA* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), *cpm60* (60-KD chaperonin), *dpr* (a putative peroxide resistance protein), *gki* (glucose kinase), *mutS* (a DNA mismatch repair enzyme), *recA* (homologous recombination factor) and *thrA* (aspartokinase/homoserine dehydrogenase) as described by King et al. (2002). MLST alleles and sequence types (STs) were assigned through the submission of the respective data to the *S. suis* MLST database.<sup>1</sup>

### Pulsed-field gel electrophoresis

Molecular typing was performed by PFGE as previously described (Vela et al., 2003). The restriction enzyme *Bsp*120I was used for digestion of genomic DNA. Re-

striction patterns were analysed and the dendrogram was constructed based on unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis using BioNumerics software 4.0 (Applied Maths).

### Multiple-locus variable number tandem repeat analysis

Investigation of variable number tandem repeat loci was performed as described previously (Li et al., 2010) using single PCR, with the exception of tandem repeat 9, which was excessively polymorphic and therefore was replaced by a new locus (SSTR1862\_46pb\_361\_3.9U) designed in the present study. Search for this new locus was based on the analysis of the genome sequences of *S. suis* 98HAH33 and 05ZYH33 using the tandem repeats database (Denoeud and Vergnaud, 2004) with the following parameters: total length (between 100 and 100,000), unit length (between 20 and 5000) and percent matches (>70%).<sup>2</sup> Only repeat units at least 10 bp long were evaluated.

The new locus was designated using the nomenclature described previously (Savires and Songer, 2005): SSTR locus position, size of repeat unit, PCR product length repeat number. The primer sequences were SSTR18-F (5'-ATCACACGGTTAGCCAAAGG-3') and SSTR18-R (5'-GCAGGTGTAGCCGTATGTT-3'). The PCR amplification conditions for this locus were: an initial denaturing at 95 °C for 10 min followed by 35 cycles of amplification: 95 °C for 1 min, annealing temperature at 65 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min; with a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified products were resolved using electrophoresis on horizontal 3% agarose gel (Bio-Rad) at a voltage of 90 V/cm for approximately 3 h using TAE 1 X (Bio-Rad). A 100 bp DNA Ladder (Biotools) was included in all gels to determine the size of the amplified DNA fragments.

The genotyping data obtained were used to construct a phylogenetic tree based upon the UPGMA method.<sup>3</sup> The discriminatory power of the technique was calculated using the Simpson's index (Hunter, 1990). This index was also used to estimate the discriminatory power of the other two methods, PFGE and MLST.

### Statistical analysis

The chi-square test was performed to analyse the differences between production systems and virulence genotypes, sequence types, PFGE patterns and MLVA profiles, using the WinPepi program version 11.25.<sup>4</sup> Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

One hundred twenty-eight isolates of *S. suis* were recovered from 88 tonsils of the 182 IPs examined (carrier rate of 48.4%). Carrier rate differences between MIP (51.4%) and CIP (45.1%) were not significant ( $P > 0.05$ ). The distribution of the serotypes in tonsils from IPs according to the production system is shown in Table 1. Serotype 1 (12 isolates, 9.4%) and serotype 2 (11 isolates, 8.6%) were the most common, followed by serotype 9 (9 isolates, 7%). Only one isolate of serotype 7 (1.2%) was found. Other serotypes identified included serotypes 3, 4, and 31 (Table 1). Eighteen isolates (14.1%) reacted with more than one antiserum and 37 (28.9%) were non-typeable isolates.

Most clinical isolates recovered from diseased CIPs belonged to serotype 2 ( $n = 13$ , 86.7%) and only one isolate of serotype 7 and another of serotype 9 were identified. All 33 *S. suis* tonsillar IP isolates of serotypes 1, 2, 7 and 9 (all Spanish isolates) were further characterised by PFGE, MLST, MLVA analysis and virulence factor profiling. For comparison, 15 and 41 clinical isolates from IPs and CBPs, respectively, and nine tonsillar isolates from CBPs were also included in molecular typing analysis.

On PFGE analysis, a total of 38 different pulsotypes were identified among the 98 *S. suis* isolates that could be assigned to two main clusters (Fig. 1), corresponding to the serotype distribution. Cluster A (PFGE pulsotypes 1–25) included all *S. suis* serotype 2 isolates from IP and CBP, and also included all *S. suis* serotype 1 isolates from IPs. Cluster B (PFGE 26–37) included all *S. suis* serotype 9 clinical isolates from CBPs and the only clinical strain of this serotype

<sup>2</sup> See: <http://minisatellites.u-psud.fr> (Accessed 11 October 2014).

<sup>3</sup> See: <http://pubmlst.org/software/> (Accessed 11 October 2014).

<sup>4</sup> See: <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>.

<sup>1</sup> See: <http://ssuis.mlst.net> (Accessed 11 October 2014).

# ARTICLE IN PRESS

V.S. Rey et al./The Veterinary Journal (2014) ■■■■■■

3

**Table 1**  
Serotype distribution of the *Streptococcus suis* tonsillar isolates recovered from 'cebo' Iberian pigs (CIPs) and 'montañera' Iberian pigs (MIPs).

Serotype	Number of tonsillar isolates (%)		
	CIP	MIP	Total
1	3 (6.7)	9 (10.8)	12 (9.4)
2	6 (13.3)	5 (6.0)	11 (8.6)
7	–	1 (1.2)	1 (0.8)
9	5 (11.1)	4 (4.8)	9 (7.0)
4	3 (6.7)	3 (3.6)	6 (4.7)
31	–	6 (7.2)	6 (4.7)
3	4 (8.9)	1 (1.2)	5 (3.9)
Others <sup>a</sup>	13 (28.9)	10 (12.0)	23 (18.0)
Other double or triple serotypes <sup>b</sup>	3 (6.7)	15 (18.1)	18 (14.1)
Non-typeable <sup>c</sup>	8 (17.8)	29 (34.9)	37 (28.9)
Total	45	83	128

<sup>a</sup> Includes serotypes 1/2, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 21, 22, 24, 27, 28, 29, 32 and 34 that were detected in one to four isolates of the total. Serotypes 32 and 34 are reclassified as *Streptococcus orisratii* (Hill et al., 2005).

<sup>b</sup> Isolates, other than serotype 1/2, specifically reacting with antisera against two or three different serotypes. The most frequent combination was 15/34, detected in four isolates.

<sup>c</sup> Non-typeable isolates included 23 isolates with hydrophobicity values >70%, indicating that they are probably non-encapsulated (Gottschalk et al., 2013) and 14 isolates that did not agglutinate with any of the typing antisera against 35 serotypes and presented hydrophobicity values <30%.

from IPs. Both serotype 7 isolates from IPs were also included in cluster B.

A total of 23 MLVA profiles were defined in the 98 IP and CBP isolates of serotypes 1, 2, 7 and 9 examined in this study. These isolates were assigned to two clusters, A and B (Fig. 2), that grouped 39.8% and 60.2% of the isolates, respectively. Cluster A included all the serotype 9 isolates from CBPs and the 70% of the serotype 9 isolates from IPs. Cluster B grouped all serotype 1 isolates from IPs, 83.3% of serotype 2 IP isolates and 100% of serotype 2 CBP isolates ( $P < 0.05$ ).

MLST analysis showed that all clinical isolates and 54.5% of tonsillar *S. suis* serotype 2 from IPs were sequence type 1 (ST1). Two single locus variants of ST1 were identified (ST294 and ST365), based on detection of a new allele for *dpr* and *thrA*, respectively. All serotype 1 isolates from IPs were also assigned to ST1. The only clinical strain of serotype 9 from IPs belonged to sequence type 123 (ST123). Tonsillar IP isolates of this serotype were assigned to seven new sequence types (Fig. 1). The allelic gene sequences of these new STs and the GenBank accession number of the novel alleles identified are listed in the Supplementary Table (Appendix: Supplementary Table S1). Tonsillar and clinical isolates of serotype 7 recovered from IPs were assigned to the sequence type ST24.

The virulence factor profiles identified for *S. suis* isolates are shown in Fig. 1. All *S. suis* serotype 2 clinical isolates from IPs ( $n = 13$ ) possessed the *mvp+epf+/sly+* genotype, which was also present in 54.5% of the IP tonsillar isolates of this serotype ( $n = 6$ ). The only clinical isolate of serotype 9 from IPs also had the *mvp+epf+/sly+* genotype that was also observed in 22.2% of the tonsillar serotype 9 isolates from IPs. Most CBP clinical isolates of serotype 2 exhibited the genotypes *mvp+epf+/sly-* or *mvp+epf+/sly+* (73.3%). Genotype *mvp+epf+/sly-* was present in nearly half (44.4%) of the tonsillar serotype 2 isolates from CBPs. All but one serotype 9 clinical CBP isolates (96.2%) possessed the genotypes *mvp-/epf-/sly-* or *mvp-/epf-/sly+*.

## Discussion

Tonsils are traditionally considered the best sampling site for detecting the prevalence and diversity of *S. suis* carriage in pigs. Prior studies have been carried out in CBPs (Wisselink et al., 2000; Vela et al., 2003; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Gottschalk et al., 2013). However, there are no data on the carriage rates and

diversity of this pathogen in IPs, despite the economic importance of their high-value dry-cured products in national and international markets. This represents the first study of tonsillar carriage rates of *S. suis* in clinically healthy IPs at slaughter in the Iberian Peninsula, their characterisation by the major pathogenic capsular types isolated, and comparison with clinical isolates from IPs and CBPs.

The overall *S. suis* carriage rate of 48.4% among IPs at slaughter indicates that *S. suis* is widely distributed among IP animals. This carriage rate is similar to that observed by other authors investigating carrier prevalence in CBPs based on tonsillar samples from slaughtered pigs (Breton et al., 1986; Hoa et al., 2011; O'Sullivan et al., 2011). The slaughterhouses received IPs from 11 different provinces of Spain that included those with the highest population densities of IPs.<sup>5</sup> Therefore, the rate of 48.4% for *S. suis* is likely to represent an accurate estimate of *S. suis* carriage prevalence in IPs during the sampling period in Spain. Similar conclusions cannot be reached for Portugal, because of the relatively small number of animals included in the study coming from only one province.

Our carriage rate was based on bacteriological culture rather than more sensitive molecular methods (Marois et al., 2007), and the true prevalence of *S. suis* in IPs could be even higher. No significant differences in carrier rates (51.4% in MIP and 45.1% in CIP) or serotype diversity were observed between MIPs reared outdoors and CIPs reared indoors (Table 1), indicating that intensive farming does not influence *S. suis* colonisation.

Only a quarter of *S. suis* tonsillar isolates (25.7%) could be typed as capsular type 1, 2, 7 or 9 when screened by multiplex PCR (Table 1). The remaining *S. suis* isolates were serotyped using coagglutination, with a total of 22 different serotypes detected. This variety of serotypes probably represents the diversity of the *S. suis* population in IPs. A high percentage of non-typeable *S. suis* isolates recovered from tonsil samples of IPs (28.9%, Table 1) has been previously reported in isolates from nasal cavities or tonsils in CBPs (Brisebois et al., 1990; Han et al., 2001; Marois et al., 2007). In the present study, around 60% of non-typeable strains were shown to be non-encapsulated.

Comparison of the three molecular techniques, MLST, PFGE and MLVA, used for the characterisation of IP *S. suis* isolates has previously revealed that MLST had the lowest power for distinguishing *S. suis* isolates (Blume et al., 2009; Li et al., 2010; Hoa et al., 2011; van Cuyck et al., 2012). MLVA has been described as a typing method with a higher discriminative power than PFGE for *S. suis* typing (Li et al., 2010). However, in the present study PFGE exhibited a higher discriminatory power (Simpson's index of 0.96) than MLVA (Simpson's index of 0.81). Consequently, several isolates with the same MLVA type (MLVA 1, 2, 15, and 17–19) could be differentiated using PFGE (Fig. 2), confirming that PFGE is the best discrimination technique for typing *S. suis* isolates (Vela et al., 2003; Blume et al., 2009; Luque et al., 2010). However, MLVA presents some advantages over PFGE. It is rapid, reliable, comparatively inexpensive and easy to perform (Li et al., 2010; Sihvonen et al., 2011; Hu et al., 2013), enabling easier inter-laboratory comparisons.

Despite the differences between the discriminatory power of PFGE, MLST and MLVA, there was suitable agreement among the results obtained by the three typing techniques, showing a serotype-based distribution of *S. suis* IP isolates. Thus, IP isolates of serotypes 1 and 2 were grouped in the same cluster obtained by PFGE and MLVA, whereas isolates of serotypes 9 and 7 were grouped in another well-defined cluster (Figs. 1, 2). All clinical IP serotype 2 isolates were assigned to ST1 and exhibited the virulence genotype *mvp+epf+/sly+*, which agrees with previous data for *S. suis* clinical isolates of

<sup>5</sup> See: <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-comercial/mesa-del-iberico/riber-publico/censos-animales-productos> (Accessed 11 October 2014).

## ARTICLE IN PRESS

4

V.S. Rey et al./The Veterinary Journal (2014) ■■-■■-■■

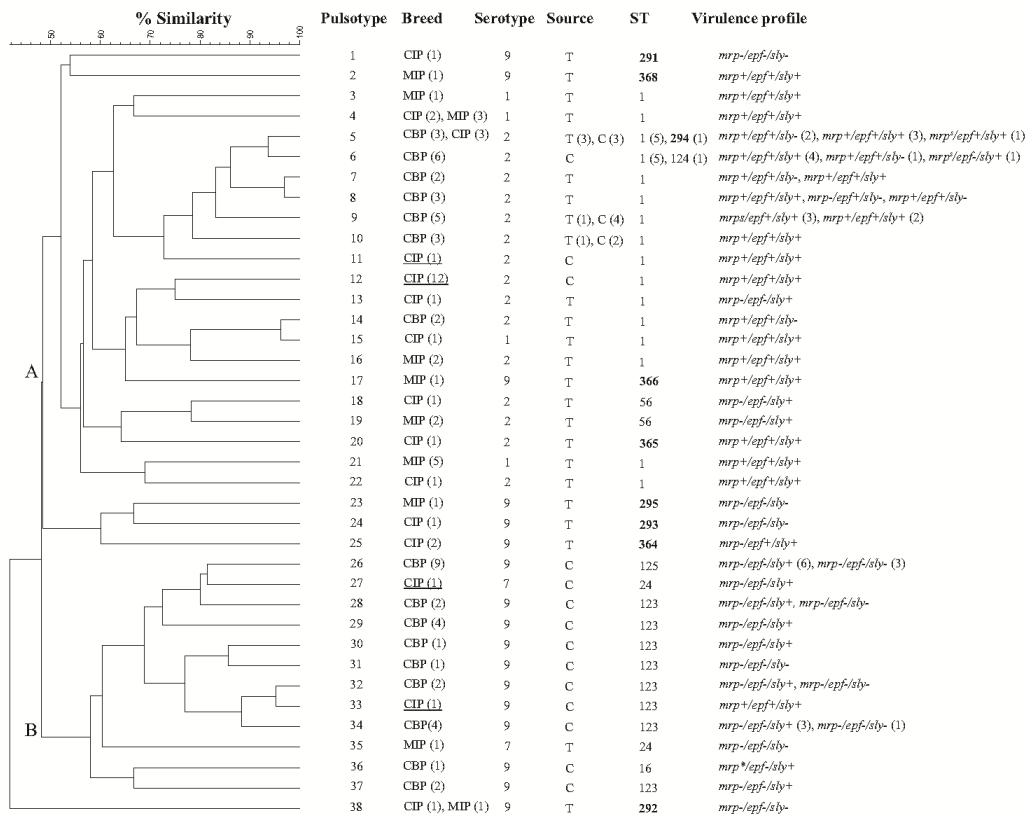


Fig. 1. Dendrogram based on pulsed-field gel electrophoresis analysis (PFGE) showing the genetic relatedness among 98 Iberian pigs and common breed pigs *Streptococcus suis* isolates. The dendrogram was constructed based on the unweighted pair group method with arithmetic mean cluster analysis. CBP, common breed pigs; CIP, 'cebo' Iberian pig; MIP, 'montañero' Iberian pig; C, clinical isolate; T, tonsillar isolate; ST, sequence type. The number of isolates of each category in the different columns is indicated in brackets. Clinical isolates from CIPs are underlined. New STs described in the present work are in bold. (A and B) Clusters obtained by PFGE analysis.

this serotype in Europe (Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Schultsz et al., 2012).

More than half (54.5%) of tonsillar IP serotype 2 isolates also belonged to ST1 and exhibited the virulence gene profile *mrp+/epf+/sly+* (Fig. 1), corroborating the role of the tonsils as a reservoir of potential pathogenic *S. suis* isolates (Luque et al., 2010; Hoa et al., 2011). The fact that some tonsillar and clinical isolates shared the same pulsotype (pulsotypes 5, 9 and 10; Fig. 1) is in agreement with this conclusion. All isolates of serotype 1 were ST1 and presented the genotype *mrp+/epf+/sly+* (Fig. 1), in agreement with previous studies (King et al., 2002; Onishi et al., 2012; Schultsz et al., 2012). These data indicate that this genetic lineage, as in CBPs, is also relatively widely distributed among IPs.

Unlike isolates of serotype 2, all tonsillar isolates of serotype 9 were singletons assigned to different new sequence types (Fig. 1 and Supplementary Table S1) and were not genetically related either to the clinical isolate of serotype 9 or to CBP isolates (Fig. 1). The only clinical isolate of serotype 9 from IPs was assigned to ST123, a sequence type already associated with clinical CBP isolates in Spain, but distantly related to the widespread European ST87 clone (Blume

et al., 2009). Both isolates of serotype 7 recovered from IPs were assigned to the sequence type ST24. This sequence type was isolated from the tonsils of CBPs in Spain (King et al., 2002) and was not genetically related to ST29 (no loci in common), a clone generally associated with serotype 7 isolates in other parts of Europe (Schultsz et al., 2012). These findings would suggest that, similar to serotype 9, isolates of serotype 7 circulating among IPs in Spain might be different from those circulating in CBPs in other parts of Europe. Additional studies including a large number of *S. suis* isolates of serotypes 7 and 9 from IPs will be necessary to confirm these results.

The results of the present study show similar *S. suis* carriage rates in IPs to those usually observed in CBPs and this rate was not affected by the IP production system (MIP or CIP) in which they were maintained. In addition, molecular typing data suggested a population of serotype 2 common to IPs and CBPs.

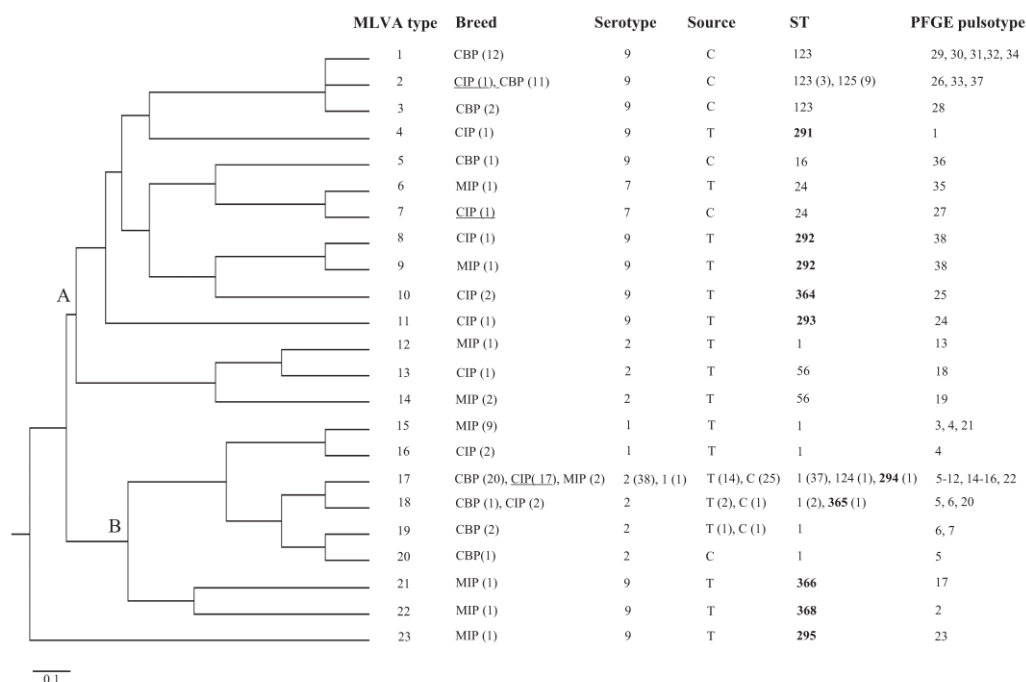
#### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that

## ARTICLE IN PRESS

V.S. Rey et al./The Veterinary Journal (2014) ■■■-■■■

5



**Fig. 2.** Dendrogram based on multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) genotyping showing the genetic relationship among 98 Iberian pigs and common breed pigs *Streptococcus suis* isolates. The dendrogram was constructed based on unweighted pair group method with arithmetic mean cluster analysis. CBP, common breed pigs; CIP, 'cebo' Iberian pig; MIP, 'montañera' Iberian pig; C, clinical isolate; T, tonsillar isolate; ST, sequence type. The number of isolates of each category in the different columns is indicated in brackets. Clinical isolates from CIPs are underlined. MLVA type 17 included the 13 clinical isolates of serotype 2 identified from CIPs. New STs described in the present work are in bold. (A and B) Clusters obtained by MLVA analysis. The scale bar represents 0.1 unit of genetic distance or dissimilarity.

could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### Acknowledgements

This work was funded by project AGL2009-14303-C02-01 of the Spanish Ministry of Science and Innovation. Verónica Sánchez del Rey is the recipient of a PhD grant (AP2008-00203) from the Spanish MEC.

#### Appendix: Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.tvjl.2014.10.020.

#### References

- Blume, V., Luque, I., Vela, A.I., Borge, C., Maldonado, A., Dominguez, L., Tarradas, C., Fernández-Garayzábal, J.F., 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *International Microbiology* 12, 161–166.
- Breton, J., Mitchell, W.R., Rosendal, S., 1986. *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers. *Canadian Journal of Veterinary Research* 50, 338–341.
- Brisebois, L.M., Charlebois, R., Higgins, R., Nadeau, M., 1990. Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets. *Canadian Journal of Veterinary Research* 54, 174–177.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., Antequera, T., 1997. Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science* 45, 263–270.
- Denoeud, F., Vergnaud, G., 2004. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: A web-based resource. *BMC Bioinformatics* 5, 4.
- Gottschalk, M., 2012. *Streptococcus*. In: Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. (Eds.), *Diseases of Swine*, Tenth Ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 841–855.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Boudreau, M., 1993. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2192–2194.
- Gottschalk, M., Segura, M., Xu, J., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: The Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews* 8, 29–45.
- Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., Grenier, D., 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. *Veterinary Microbiology* 162, 819–825.
- Han, D.U., Choi, C., Ham, H.J., Jung, J.H., Cho, W.S., Kim, J., Higgins, R., Chae, C., 2001. Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughter pigs in Korea. *Canadian Journal of Veterinary Research* 65, 151–155.
- Hill, J.E., Gottschalk, M., Brousseau, R., Harel, J., Hemmingsen, S.M., Goh, S.H., 2005. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Veterinary Microbiology* 107, 63–69.
- Hoa, N.T., Chieu, T.T.B., Nga, T.T.T., Dung, N.V., Campbell, J., Anh, P.H., Tho, H.H., Chau, N.V.V., Bryant, J.E., Hien, T.T., et al., 2011. Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam. *PLoS ONE* 6, e17943.

Please cite this article in press as: V. Sánchez del Rey, et al., Molecular typing of *Streptococcus suis* isolates from Iberian pigs: A comparison with isolates from common intensively-reared commercial pig breeds, *The Veterinary Journal* (2014), doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.020



## ARTICLE IN PRESS

6

V.S. Rey et al./The Veterinary Journal ■■ (2014) ■■–■■

- Hu, Y., Li, B., Jin, D., Cui, Z., Tao, X., Zhang, B., Zhang, J., 2013. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis typing of *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 1263–1268.
- Hunter, P.R., 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1903–1905.
- King, S.J., Leigh, J.A., Heath, P.J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C.G., Whatmore, A.M., 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3671–3680.
- Li, W., Ye, C., Jing, H., Cui, Z., Bai, X., Jin, D., Zheng, H., Zhao, A., Xu, Y., Gottschalk, M., et al., 2010. *Streptococcus suis* outbreak investigation using multiple-locus variable tandem repeat number analysis. *Microbiology and Immunology* 54, 380–388.
- Luque, I., Blume, V., Borge, C., Vela, A.I., Perea, J.A., Marquez, J.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Tarradas, C., 2010. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. *The Veterinary Journal* 186, 396–398.
- Marois, C., Le Devendec, L., Gottschalk, M., Kobisch, M., 2007. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Canadian Journal of Veterinary Research* 71, 14–22.
- Mennerat, A., Nilsen, F., Ebert, D., Skorpung, A., 2010. Intensive farming: Evolutionary implications for parasites and pathogens. *Evolutionary Biology* 37, 59–67.
- Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E., 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* 218, 79–84.
- Onishi, H., Sugawara, M., Okura, M., Ōsaki, M., Takamatsu, D., 2012. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in isolates from porcine endocarditis in East Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 74, 1681–1684.
- O'Sullivan, T., Friendship, R., Blackwell, T., Pearl, D., McEwen, B., Carman, S., Slavic, D., Dewey, C., 2011. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. *Canadian Journal of Veterinary Research* 75, 106–111.
- Rehm, T., Baums, C.G., Strommenger, B., Beyerbach, M., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2007. Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *Journal of Medical Microbiology* 56, 102–109.
- Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29–33.
- Sawires, Y.S., Songer, J.G., 2005. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* 11, 262–272.
- Schultsz, C., Jansen, E., Keijzers, W., Rothkamp, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van der Ende, A., 2012. Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PLoS ONE* 7, e33854.
- Sihvonen, L.M., Toivonen, S., Haukka, K., Kuusi, M., Skurnik, M., Siitonen, A., 2011. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimination of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. *BMC Microbiology* 11, 42.
- Silva, L.M.G., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentin-Weigand, P., 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology* 115, 117–127.
- van Cuyck, H., Pichon, B., Leroy, P., Granger-Farbos, A., Underwood, A., Soullie, B., Koeck, J.L., 2012. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with multiple loci sequence typing. *BMC Microbiology* 12, 241.
- Vela, A.I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M.A., Borge, C., Perea, J.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2498–2502.
- Wisselink, H.J., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., Vecht, U., 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary Microbiology* 74, 237–248.

## Highlights

- *S. suis* isolates from Iberian pigs (IP) were molecularly characterised for the first time.
- IP showed similar *S. suis* carriage rates to those observed in common breed pigs (CBP).
- *S. suis* carriage rate is not affected by the system (outdoor/indoor) in which IP are bred.
- Molecular typing data suggest a population of serotype 2 common to IP and CBP.
- Knowledge of *S. suis* diversity will contribute to understand the population structure of this pathogen.

Supplementary Table 1

Allelic profiles corresponding to new STs and GenBank accession numbers for the new alleles detected in the present study.

ST	serotype	<i>aroA</i>	<i>cpn60</i>	<i>dpr</i>	<i>gki</i>	<i>mutS</i>	<i>recA</i>	<i>thrA</i>
291	9	106* (HF913603)	95	89* (HF913607)	93	124* (HF913612)	23	90* (HF913616)
292	9	49* (HF913604)	93* (HF912710)	90* (HF913608)	119* (HF913611)	125* (HF913613)	26	8
293	9	108* (HF912703)	44	46	39	33	26	76
294	2	1	1	91* (HF913609)	1	1	1	1
295	9	1	128* (HF913606)	92* (HF913610)	1	126* (HF913614)	102* (HF913615)	1
364	9	105	158* (HG001263)	40	148* (HG001267)	98	20	80
365	2	1	1	1	1	1	1	107* (HG001271)
366	9	135* (HG001262)	159* (HG001264/)	117* (HG001266)	39	91	76	70
368	9	43	160* (HG001265)	116	149* (HG001268)	151* (HG001269)	120* (HG001270)	70

\*Novel allele identified in this study (GenBank accession number)





## Capítulo III.III

# Detección de genes asociados a la virulencia en aislados de *S. suis* procedentes de ganado porcino y animales silvestres

---



Los métodos de tipificación molecular son capaces de discriminar las variaciones genéticas entre cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana, así como discriminar las diferentes líneas clonales presentes en una población bacteriana. Para el estudio de la diversidad de las poblaciones de *S. suis* se han empleado diferentes métodos moleculares, como el ribotipado (Staats y col., 1998; Rasmussen y col., 1999), PFGE (Vela y col., 2003; Blume y col., 2009; Luque y col., 2010), MLST (King y col., 2002; Blume y col., 2009) o MLVA (Li y col., 2010).

El análisis de los genes asociados a la virulencia también ha sido utilizado para la diferenciación molecular de diferentes patógenos bacterianos (Ferreira y col., 2012; Elemfareji y col., 2013; Nowrouzian y col., 2013). La mayoría de los estudios que han utilizado dicha técnica molecular para la caracterización de aislados de *S. suis*, han investigado la presencia de los genes tradicionalmente asociados a la virulencia, *mrp*, *epf* y *shy*, en aislados porcinos o humanos (Wisselink y col., 2000; Rehm y col., 2007; Blume y col., 2009; Fittipaldi y col., 2009; Schultz y col., 2012; Zhu y col., 2013). Sin embargo, apenas existen estudios que hayan investigado la presencia de otros genes que se encuentran relacionados con la virulencia y estos escasos trabajos no han incluido aislados procedentes de otras especies animales.

Así, en el presente Capítulo el objetivo fue investigar la distribución de diferentes genes relacionados con la virulencia, *sao*, *impdh*, *corR*, *srtA*, *dpp* y *dltA*, además de los tradicionales, *mrp*, *epf* y *shy*, en aislados de los serotipos 2 y 9 procedentes de la especie porcina y las especies silvestres, conejo y jabalí.

En base a la presencia/ausencia de los genes investigados se obtuvieron 31 perfiles genéticos. El análisis de dichos perfiles evidenció la existencia de diferencias genéticas entre los aislados de los serotipo 2 y 9. Los aislados de ambos serotipos se asignaron a grupos genéticos diferentes y ninguno de los aislados de serotipo 2 mostró un perfil en común con los aislados de serotipo 9.

Por otra parte, los resultados mostraron la existencia de genotipos claramente diferenciados entre la población de aislados de *S. suis* procedentes de la especie porcina y de animales silvestres. Los genes *epf*, *shy*, *mrp*, *sao* y *dltA* no se detectaron

en la mayoría de los aislados de jabalí y conejo silvestre, mientras que se encontraron presentes en la mayoría de los aislados de cerdo. Asimismo, los perfiles detectados más frecuentemente entre los aislados porcinos (VP16 y VP26) fueron distintos a los encontrados en las especies silvestres (VP7 y VP8). Además, se pudo establecer una asociación entre dichos perfiles prevalentes y determinados ST obtenidos mediante la técnica MLST. Por tanto, el análisis de los factores asociados a la virulencia estudiados podría ser una herramienta en la tipificación molecular de aislados de *S. suis*.

**Artículo enviado a la revista “*Veterinary Microbiology*”**

**Molecular screening of virulence-associated genes among  
*Streptococcus suis* isolates recovered from wild animals and pigs**

Verónica Sánchez del Rey<sup>a</sup>, José F. Fernández-Garayzábal<sup>a,b</sup>, Lucas  
Domínguez<sup>a</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>c</sup>, Ana I. Vela<sup>a,b,\*</sup>.

<sup>a</sup> *Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense,  
28040 Madrid, Spain.*

<sup>b</sup> *Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense,  
28040 Madrid, Spain.*

<sup>c</sup> *Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine,  
Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St.-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada.*

\* Corresponding author at Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria  
(VISAVET), Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

Tel.: +34 913943709; fax: +34 913943795;

E-mail address: [avela@vet.ucm.es](mailto:avela@vet.ucm.es) (A.I. Vela)

## Abstract

*Streptococcus suis* is an important zoonotic pathogen associated with a wide range of diseases in pigs but has also been isolated from wild animals such as rabbits and wild boars. A total of 126 *S. suis* isolates recovered from pigs (n=85) and wild boars (n= 41) were tested by PCR for presence of 9 virulence-associated genes (*epf*, *shy*, *mrp*, *sao*, *impdb*, *covR*, *srtA*, *dpp* and *dltA*) that were further compared with the distribution of these genes observed in 56 tonsillar isolates of serotype 9 from wild rabbits. The *epf*, *shy*, *mrp*, *sao* and *dltA* genes were detected in 0%, 1.0%, 1.0%, 2.1% and 11.5% of the wild rabbits and wild boars isolates, respectively, while were detected in 56.5%, 75.3%, 56.5%, 88.2% and 88.2% of the pig isolates ( $P<0.05$ ). There was a correlation between the variants *saoM* and *saoL*, and serotypes 2 and 9, respectively ( $P<0.05$ ). *S. suis* isolates were classified into 31 VPs. VP1, VP7 and VP8 included the 84.8% of serotype 9 tonsillar isolates from wild rabbits and wild boars. VP16 and VP26 incorporated most (66.1%) of the clinical pig isolates. VP16 was detected exclusively in clinical pig isolates of serotype 9 and VP26 was detected in 71.4% of the serotype 2 clinical pig isolates. MLST analysis showed the associations of VP7 and VP8 with ST216, VP16 and VP17 with ST123 and ST125 and VP26 with ST1.

**Key words:** *Streptococcus suis*, virulotyping, MLST.

## Introduction

*Streptococcus suis* is an important zoonotic pathogen associated with a wide range of diseases in pigs, including meningitis, septicemia and pneumonia (Gottschalk, 2012). It causes several losses to the swine industry but it is also recognized as an emerging human pathogen (Gottschalk et al., 2010). Furthermore, *S. suis* has been isolated from wild animals, such as rabbits and wild boars, that have been recognized as reservoir of *S. suis* (Baums et al., 2007; Sánchez del Rey et al., 2013; Sánchez del Rey et al., 2014).

Subtyping of pathogen isolates is important for tracing new or previously found clones. The diversity of *S. suis* has been studied using a variety of different methods, including serotyping, ribotyping (Staats et al., 1998; Rasmussen et al., 1999), random amplified polymorphic DNA (RADP; Martínez et al., 2002; Cloutier et al., 2003), pulsed field gel electrophoresis (PFGE; Vela et al., 2003; Blume et al., 2009; Luque et al., 2010), multilocus sequence typing (MLST; King et al., 2002; Blume et al., 2009) or multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA; Li et al., 2010). The analysis of virulence genes profiles has been used for molecular differentiation of different bacterial pathogens (Nowrouzian et al., 2013; Schierack et al., 2013). The majority of studies that have evaluated the usefulness of this technique for molecular analysis of *S. suis*, have investigated only the presence of the genes *sly*, *epf* and *mrp*, encoding the virulence-associated markers suilysin (SLY), extracellular factor (EF) and muramidase-released (MRP) protein, respectively. These studies have included basically human and/or swine isolates (Wisselink et al., 2000; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Fittipaldi et al., 2009; Schultsz et al., 2012).

Data on virulence factors other than *epf*, *sly* and *mrp* have been described for *S. suis* isolates from wild rabbits (Sánchez del Rey et al., 2013). The current investigation is aimed to study the presence of different virulence associated genes on *S. suis* isolates from pigs and wild boars and further comparison with the



distribution of these genes observed in wild rabbits (Sánchez del Rey et al., 2013). These data may lead to a better understanding of *S. suis* epidemiology.

## Materials and methods

### *S. suis* isolates

In this study, the virulence-associated gene profiles of 126 *S. suis* isolates recovered from swine (n=85) and wild boar (n= 41) were investigated. Swine isolates included 29 tonsillar (serotype 2, n= 20 and serotype 9, n=9) and 56 clinical (serotype 2, n= 28 and serotype 9, n=28) isolates. Except one clinical isolate of serotype 2, tonsillar and clinical wild boar isolates were all of serotype 9 (n=36 and n=4, respectively). For comparison purposes, 56 tonsillar isolates of serotype 9 from wild rabbits were included in this study (Sánchez del Rey et al., 2013). MLST analysis of *S. suis* isolates from pigs was performed as described previously (King et al., 2002). MLST data of wild boars and wild rabbits were retrieved from previous studies (Sánchez del Rey et al., 2013; Sánchez del Rey et al., 2014)(Table 2).

### *Virulence factors*

Nine previously virulence-associated factors were studied: muramidase released protein (*mvp*), extracellular protein factor (*epf*), suilysin (*shy*), surface antigen protein (*sao*), orphan response regulator (*CovR*), di-peptidyl peptidase IV (*dpp*), inosine 5-monophosphate dehydrogenase (*impdh*), transpeptidase mediating covalent linkage of surface proteins to peptidoglycan (*srtA*) and D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase (*dltA*). The detection of the virulence-associated factors was performed by PCR as described previously (Sánchez del Rey et al., 2013). Differentiation of *mvp* and *epf* variants was carried out by monoplex PCR assays as described previously (Silva et al., 2006). The amplified products were resolved using electrophoresis on a horizontal 1.5% (w/v) agarose gel (Bio-Rad) at a voltage of 90 V/cm for approximately 30 min. The products were analyzed and photographed using a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad). The virulence profiles obtained were used to construct a phylogenetic tree based upon the UPGMA method.

*Statistical analysis.*

The chi-square test was used to analyze the relationship between *S. suis* virulence profiles and capsular types, source of origin, species and ST. Analyses were carried out using the WinPepi program [version 11.25; (<http://www.epi-perspectives.com/content/8/1/1>)]. Differences were considered significant at  $P<0.05$ .

**Results**

The detection rates of the virulence-associated genes was similar among wild boar and wild rabbit *S. suis* isolates (Table 1). Most *S. suis* isolates from both wild animal species belonged to serotype 9 and were distinguished, regardless they were tonsillar or clinical, by the low detection rates of the *epf*, *sly*, *mrp*, *sao* and *dltA* genes (0%, 1.0%, 1.0%, 2.1% and 11.5%, respectively). The single serotype 2 isolate from wild boars also lacked the *epf*, *sly* and *mrp* genes, but was positive for *sao* and *dltA* genes (Table 1). These genes were detected in at least half of the *S. suis* pig isolates (56.5%, 75.3%, 56.5%, 88.2.0% and 88.2%, respectively). These differences in the content of the tested virulence associated genes between *S. suis* isolates from wild animals and pigs were statistically significant ( $P<0.05$ ).

*S. suis* isolates exhibited some differences based on serotype and source of isolation. Thus, the genes *epf*, *sly*, *mrp*, *sao*, *impdh* and *dltA* were detected in lower proportions in serotype 9 (3.8%, 19.5%, 4.5%, 21.8%, 27.8% and 28.6%, respectively) than in serotype 2 (87.8%, 79.6%%, 87.8%, 100%, 93.9% and 100%, respectively) isolates ( $P<0.05$ ). Additionally, all but three serotype 9 isolates (98.5%) carrying the *sao* gene showed the *saoL* variant, whereas all but one serotype 2 isolates showed the *saoM* variant. Overall, tonsillar isolates exhibited lower detection rates ( $P<0.05$ ) for the *epf*, *sly*, *mrp*, *sao*, *dpp* and *dltA* genes (15.7%, 16.5%, 14.9%, 18.2%, 72.7% and 23.9%, respectively) than clinical isolates (47.5%, 73.8%, 50.8%, 91.8%, 95.1%, 95.1, respectively).

On the basis of the presence or absence of the tested virulence-associated genes and the variants of the *mrp* and *sao* genes, the 182 *S. suis* isolates from pigs, wild boars and wild rabbits were classified into 31 virulence-associated gene profiles (VPs) (Fig. 1 and Table 2). Eleven VPs were detected among wild animal isolates and 22 VPs among pig isolates, with only two VPs (VP1 and VP7) including isolates from both wild animals and pigs (Table 2). The genetic relationship based on the virulence-associated gene profiles among the *S. suis* isolates after the UPGMA clustering is shown in Figure 1. Two main clusters (A and B) were detected, being a statistical association ( $P<0.05$ ) between serotype 9 and cluster A (included the 95.5% of serotype 9 isolates) and serotype 2 and cluster B (included the 89.8% of serotype 2 isolates). Five VPs (VP1, VP7, VP8, VP16 and VP26) included most (70.9%) of the *S. suis* isolates. VP1 (*epf*-/*shy*-/*mrp*-/*sao*-/*impdh*-/*covR*+/*srtA*+/*dpp*-/*dltA*-), VP7 (*epf*-/*shy*-/*mrp*-/*sao*-/*impdh*-/*covR*+/*srtA*+/*dpp*+/*dltA*-) and VP8 (*epf*-/*shy*-/*mrp*-/*sao*-/*impdh*+/*covR*+/*srtA*+/*dpp*+/*dltA*-) were more frequently detected in wild rabbits and wild boars and included the 84.8% of serotype 9 tonsillar isolates from both animal species. On the other hand, VP16 (*epf*-/*shy*+/*mrp*-/*saoL*-/*impdh*-/*covR*+/*srtA*+/*dpp*+/*dltA*+) and VP26 (*epf*+/*shy*+/*mrp*+/*saoM*-/*impdh*+/*covR*+/*srtA*+/*dpp*+/*dltA*+) incorporated most (66.1%) of the clinical pig isolates. VP16 was detected exclusively in clinical pig isolates of serotype 9 and VP26 was the most frequently detected (71.4%) in clinical pig isolates of serotype 2. VP26 included also the 45% of the tonsillar pig isolates of serotype 2. No common virulence profiles were detected between serotypes. MLST analysis showed the associations ( $P<0.05$ ) of VP7 and VP8 with ST216, VP16 and VP17 with ST123 and ST125 and VP26 with ST1 (Table 2).

## Discussion

*S. suis* is one of the most important swine pathogens worldwide and is considered a major problem in the swine industry (Gottschalk, 2012). In addition to serotype 2, the most prevalent serotype associated with disease in pigs (Wisselink et al., 2000; Gottschalk et al., 2007; Wei et al., 2009), other serotypes, such as serotype

9, have gained relevance in the last years (Wisselink et al., 2000; Silva et al., 2006; Blume et al., 2009; Schultsz et al., 2012). *S. suis*, particularly isolates of serotype 9, have also been isolated from different wild animal species such as wild boars (Baums et al., 2007; Sánchez del Rey et al., 2014) and more recently from wild rabbits (Sánchez del Rey et al., 2013). Distribution of virulence associated genes, mainly *epf*, *sly* and *mrp* have been studied basically in *S. suis* serotype 2 isolates from pigs (Wisselink et al., 2000; Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Fittipaldi et al., 2009; Schultsz et al., 2012), being only a very limited data on virulence associated genes in isolates from wild animals and other serotypes (Baums et al., 2007; Sánchez del Rey et al., 2013; Sánchez del Rey et al., 2014). In the present work, in addition to these traditional virulence markers, we have compared by first time the distribution of several additional genes associated with virulence in *S. suis* serotypes 2 and 9 isolates in pigs, wild boars and wild rabbits. In addition, the virulence genetic profiles (VPs) were further associated with their allelic profiles based on previous MLST analysis (Sánchez del Rey et al., 2013; Sánchez del Rey et al., 2014).

The results of the present work show that a great majority of the *S. suis* isolates from both wild animal species lacked the *epf*, *sly*, *mrp*, *sao* and *dltA* genes, but these genes were presented in most of the pig isolates (Table 1;  $P<0.05$ ). *S. suis* from pigs included both clinical and tonsillar isolates, but most of the wild animal *S. suis* isolates (94.8%) were from tonsils which could bias the results. A more detailed comparison of these isolates with tonsillar pig isolates gave similar results. Thus, the *epf*, *sly*, *mrp*, *sao*, *impdb* and *dltA* genes were detected in the 0%, 1.1%, 1.1%, 2.2%, 35.9% and 9.8%, respectively of the tonsillar *S. suis* isolates from wild animals, while the percentage of tonsillar isolates from pigs harboring these genes was 65.5%, 65.5%, 58.6%, 69%, 62.1% and 69% ( $P<0.05$ ). Except for the *dltA* gene, these differences were also observed when comparing clinical isolates from wild animals and pigs (Table 1), but this result should be confirmed with further studies including more clinical isolates from wild boars and wild rabbits. Differences between domestic and wild animal isolates have been observed also in other pathogens such as *Escherichia coli* (Schierack et al., 2013). These differences in the

presence of several virulence associated genes between *S. suis* isolates from wild animals and pigs could be useful for epidemiological purposes.

There was a correlation between the variant of the *sao* gene and serotypes 2 or 9 ( $P<0.05$ ). Nearly all isolates of serotype 9 *sao*<sup>+</sup> (89.7%), showed the *saoL* variant, whereas the 98% of the serotype 2 isolates presented the *saoM* variant (Fig. 1). The prevalence of the variant *saoM* among isolates of serotype 2 had been previously reported (Feng et al., 2007); however, this is the first description of the association of variant *saoL* with serotype 9.

Some differences based on serotype and source of isolation were observed in the 31 different VPs obtained based the presence/absence of the tested virulence associated genes and the variants of the *mrp* and *sao* genes (Table 2 and Fig. 1). The UPGMA analysis of these VPs resulted in a clear division of serotypes 2 and 9 in two main clusters (Fig. 1) with most isolates of serotype 9 being included in cluster A and most serotype 2 isolates grouped in cluster B ( $P<0.05$ ). Similar results have been reported after PFGE analysis with isolates of serotype 2 and 9 belonging to different PFGE clusters (Vela et al., 2003; Blume et al., 2009), which emphasizes the idea of the different genetic background for isolates of both serotypes. Different studies have analyzed the association of prevalent STs among clinical pig isolates and the MRP/EF/SLY phenotypes and/or *mrp/epf/sly* genotypes (Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Tang et al., 2011). We also observed a significant correlation between particular VPs and STs ( $P<0.05$ ; Table 2). Thus, VP16 that included many (60.7%) of the clinical pig isolates of serotype 9 (Table 2) was characterized by the lack of *epf*, *mrp* and *impdh* genes (Fig. 1) and correlated with ST123 or ST125 previously reported in Spain for clinical serotype 9 isolates (Blume et al., 2009). On the other hand, VP26 possessed all the virulence genes tested and was associated to ST1 including nearly three-quarters (71.4%) of the clinical pig isolates of serotype 2. These results are in agreement with previous works that show that clinical pig isolates belonging to ST1 are typically *epf*<sup>+</sup>/*sly*<sup>+</sup>/*mrp*<sup>+</sup> (Rehm et al., 2007; Blume et al., 2009; Tang et al., 2011), but none of these studies determined the presence of the remaining genes included in this study. Nearly half

of tonsillar pig isolates of serotype 2 also belonged to VP26 and ST1 (or single locus variants of ST1, the ST294 and ST365). The remaining tonsillar isolates of serotype 2 belonged to ST1 and ST56 and exhibited the profiles VP13, VP14, VP25, VP27, VP29-31 (Table 2; Fig 1) which is in agreement with the genetic heterogeneity usually observed among tonsillar *S. suis* isolates (Beaudoin et al., 1992). These results also indicate the relationship between tonsillar and clinical isolates of this serotype and emphasize the role on tonsils as potential source of clinical strains of *S. suis* (Luque et al., 1999; Luque et al., 2010; Hoa et al., 2011).

Clinical isolates of *S. suis* from pigs exhibited different VPs, that basically harbored all or most of the virulence-associated genes investigated (Table 2 and Fig. 1). In our study, all but one of the ST1 isolates were assigned to VP26 that possessed all the virulence genes tested or VP25, VP27-31 that also harbored at least 7 of these genes (Fig. 1). ST1 represents a highly successful clone widely distributed among the *S. suis* population of serotype 2 that has been strongly associated with clinical cases in swine and humans in Europe and Asia (King et al., 2002; Blume et al., 2009; Schultsz et al., 2012). Thus, we could speculate a relationship between the content of virulence-associated genes and the potential hazard of the *S. suis* strains. On the other hand, the clinical pig isolates of serotype 9 belonged to ST123 and ST125 and lacked 3-4 genes (Fig. 1). The clinical *S. suis* isolates from wild boars exhibited VPs and belonged to STs different to those of clinical pig isolates. The clinical serotype 2 isolate belong to ST281 and VP12 and the four clinical isolates of serotype 9 belonged to VP1, VP5, VP6 and VP9 (Table 2) characterized by the lack of 5-7 of the investigated genes (Fig. 1). These data indicate that, the absence of one or more of the investigated genes does not necessarily denote a lack of virulence and therefore, although they can play a certain role in virulence of *S. suis* (Fittipaldi et al., 2012), none should be critical factors. In this sense, recent studies have demonstrated that an isogenic  $\Delta sae$  mutant of *S. suis* had similar capacity of adhesion/invasion of swine respiratory epithelial cells, resistance to phagocytosis by macrophages and virulence to the parent strain, suggesting that *sae* is not a critical factor in *S. suis* virulence (Roy et al., 2014). Moreover, previous studies have investigated the presence of *mvp*, *sly* and *epf*

virulence associated factors in *S. suis* isolates from North America and showed that the presence of these genes did not always correlate with the clinical disease, indicating that these factors are linked to, but not essential for the virulence of *S. suis* (Fittipaldi et al., 2009; Fittipaldi et al., 2011; Gottschalk et al., 2013). Tonsillar isolates also exhibited identical ST and VP to those from some clinical isolates (Table 2 and Fig. 1). All together, these data suggest that virulence profiling, although can be a useful tool for characterizing *S. suis* in epidemiological studies, it would not be practical for predicting the potential virulence of *S. suis* isolates.

The present study has provided novel information on the prevalence and distribution of various virulence associated factors in wild animals (rabbit and wild boar) and pig isolates of *S. suis* that may lead to a better understanding of the global epidemiology of this pathogen.

## Acknowledgements

This work was supported by the project AGL2009-14303-C02-01 of the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). Verónica Sánchez del Rey is the recipient of a PhD grant from the Spanish MEC.

## References

- Baums, C.G., Verkuhlen, G.J., Rehm, T., Silva, L.M., Beyerbach, M., Pohlmeier, K., Valentin-Weigand, P., 2007. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. Appl. Environ. Microbiol. 73, 711-717.
- Beaudoin, M., Harel, J., Higgins, R., Gottschalk, M., Frenette, M., MacInnes, J.I., 1992. Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with an rDNA probe. J. Gen. Microbiol. 138, 2639-2645.
- Blume, V., Luque, I., Vela, A.I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., Fernández-Garayzábal, J.F., 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. Int. Microbiol. 12, 161-166.

- Cloutier, G., D'Allaire, S., Martínez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., Gottschalk, M., 2003. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet. Microbiol.* 97, 135-151.
- Feng, Y., Zheng, F., Pan, X., Sun, W., Wang, C., Dong, Y., Ju, A.P., Ge, J., Liu, D., Liu, C. et al., 2007. Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 80-88.
- Fittipaldi, N., Fuller, T.E., Teel, J.F., Wilson, T.L., Wolfram, T.J., Lowery, D.E., Gottschalk, M., 2009. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and sulysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Vet. Microbiol.* 139, 310-317.
- Fittipaldi, N., Xu, J., Lacouture, S., Tharavichitkul, P., Osaki, M., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Gottschalk, M., 2011. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2239-2244.
- Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D., Gottschalk, M., 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* 7, 259-279.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Boudreau, M., 1993. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2192-2194.
- Gottschalk, M., Segura, M., Xu, J., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 29-45.
- Gottschalk, M., Xu, J., Calzas, C., Segura, M., 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?. *Future Microbiol.* 5, 371-391.
- Gottschalk, M., 2012. Streptococcis. In: J. Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson G. (Eds.), *Diseases of Swine*, 10<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 841-855.
- Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., Grenier, D., 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. *Vet. Microbiol.* 162, 819-825.
- Hoa, N.T., Chieu, T.T.B., Nga, T.T.T., Dung, N.V., Campbell, J., Anh, P.H., Tho, H.H., Chau, N.V.V., Bryant, J.E., Hien, T.T. et al., 2011. Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing



- human infection in southern Vietnam. PLoS ONE 6:e17943. doi:10.1371/journal.pone.0017943.
- King, S.J., Leigh, J.A., Heath, P.J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C.G., Whatmore, A.M., 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. J. Clin. Microbiol. 40, 3671-3680.
- Li, W., Ye, C., Jing, H., Cui, Z., Bai, X., Jin, D., Zheng, H., Zhao, A., Xu, Y., Gottschalk, M., Xu, J., 2010. *Streptococcus suis* outbreak investigation using multiple-locus variable tandem repeat number analysis. Microbiol. Immunol. 54, 380-388.
- Luque, I., Tarradas, C., Astorga, R., Perea, A., Wisselink, H.J., Vecht, U., 1999. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. Res. Vet. Sci. 66, 69-72.
- Luque, I., Blume, V., Borge, C., Vela, A.I., Perea, J.A., Márquez, J.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Tarradas, C., 2010. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. Vet. J. 186, 396-398.
- Martinez, G., Harel, J., Lacouture, S., Gottschalk, M., 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. Can. J. Vet. Res. 66, 240-248.
- Nowrouzian, F.L., Karami, N., Welinder-Olsson, C., Ahren, C., 2013. Virulence gene typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a complement in epidemiological typing. J. Microbiol. Methods. 93, 173-176.
- Rasmussen, S.R., Aarestrup, F.M., Jensen, N.E., Jorsal, S.E., 1999. Associations of *Streptococcus suis* serotype 2 ribotype profiles with clinical disease and antimicrobial resistance. J. Clin. Microbiol. 37, 404-408.
- Rehm, T., Baums, C.G., Strommenger, B., Beyerbach, M., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2007. Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. J. Med. Microbiol. 56, 102-109.
- Roy, D., Fittipaldi, N., Dumesnil, A., Lacouture, S., Gottschalk, M., 2014. The protective protein Sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 2. Microb. Pathog. 67-68, 31-35.
- Sánchez del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J.F., Briones, V., Iriso, A., Domínguez, L., Gottschalk, M., Vela, A.I., 2013. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates from wild rabbits. Vet. Microbiol. 165, 483-486.

- Sánchez Del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J.F., Mentaberre, G., Briones, V., Lavín, S., Domínguez, L., Gottschalk, M., Vela, A.I., 2014. Characterisation of *Streptococcus suis* isolates from wild boars (*Sus scrofa*). Vet. J. 200, 464-467.
- Schierack, P., Rodiger, S., Kuhl, C., Hiemann, R., Roggenbuck, D., Li, G., Weinreich, J., Berger, E., Nolan, L.K., Nicholson, B. et al., 2013. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. PLoS ONE 8:e59242. doi:10.1371/journal.pone.0059242.
- Schultsz, C., Jansen, E., Keijzers, W., Rothkamp, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van der Ende, A., 2012. Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. PLoS ONE 7:e33854. doi:10.1371/journal.pone.0033854.
- Silva, L.M., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentin-Weigand, P., 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. Vet. Microbiol. 115, 117-127.
- Staats, J.J., Plattner, B.L., Nietfeld, J., Dritz, S., Chengappa, M.M., 1998. Use of ribotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *Streptococcus suis* type 2 isolates. J. Clin. Microbiol. 36, 15-19.
- Tang, Y., Zhao, H., Wu, W., Wu, D., Li, X., Fang, W., 2011. Genetic and virulence characterization of *Streptococcus suis* type 2 isolates from swine in the provinces of Zhejiang and Henan, China. Folia Microbiol. (Praha). 56, 541-548.
- Vela, A.I., Goyache, J., Tarradas, C., Luque, I., Mateos, A., Moreno, M.A., Borge, C., Perea, J.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41, 2498-2502.
- Wei, Z.G., Li, R., Zhang, A.D., He, H.K., Hua, Y.F., Xia, J., Cai, X.H., Chen, H.C., Jin, M.L., 2009. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. Vet. Microbiol. 137, 196-201.
- Wisselink, H.J., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., Vecht, U., 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. Vet. Microbiol. 74, 237-248.

**Table 1**

Distribution of virulence associated genes among *S. suis* isolates from pigs, wild boars and wild rabbits.

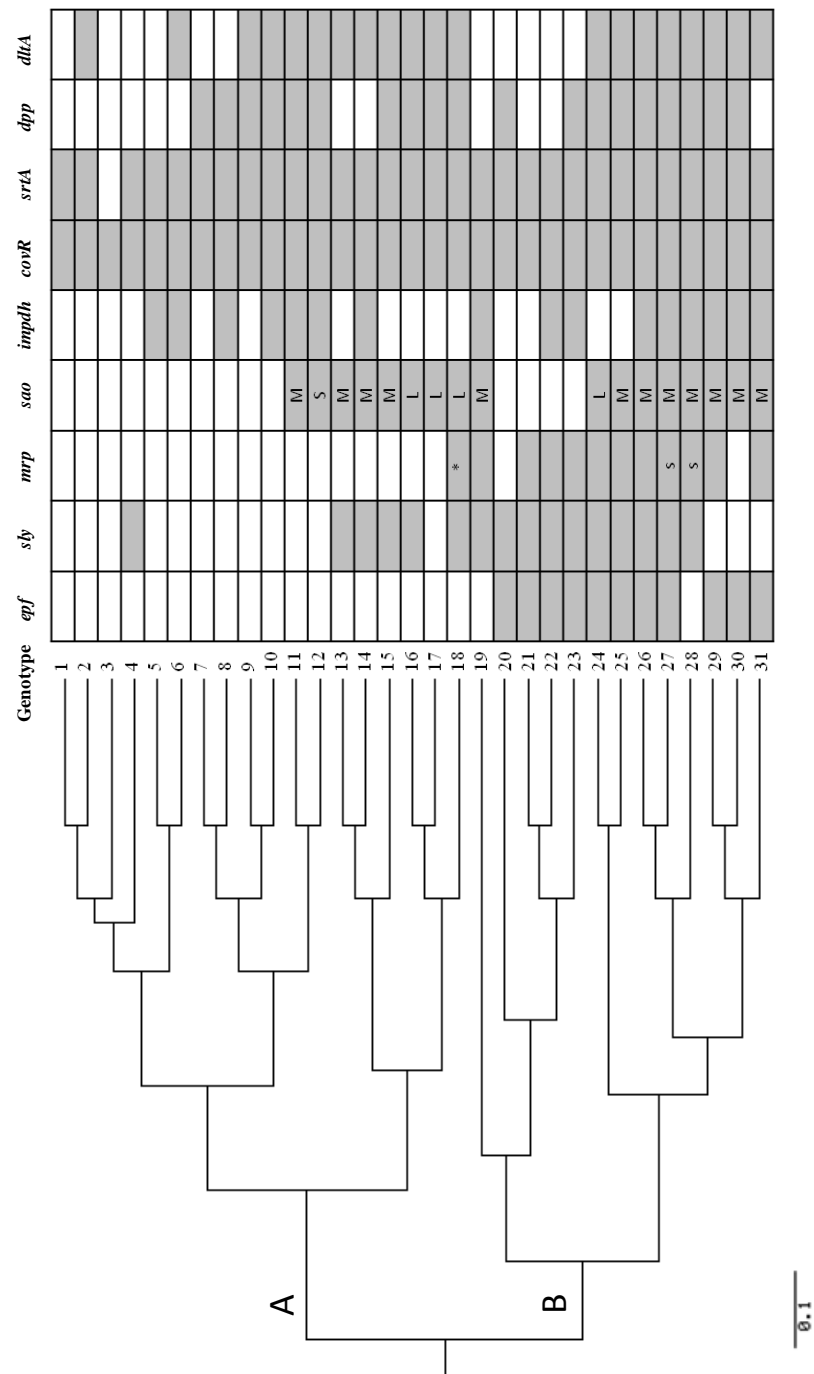
Species	Serotype	Samples		Total isolates	<i>epf</i>	<i>sly</i>	<i>mrp</i>	<i>sao</i>	<i>impdh</i>	<i>covR</i>	<i>strA</i>	<i>dpp</i>	<i>dlta</i>
		Tonsillar	Clinical										
Wild boar	9	36	----	36	0	1	1	1	10	36	36	19	6
		----	4	4	0	0	0	0	2	4	4	1	2
	2	----	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Wild rabbit*	Total	----	----	41	0	1	1	2	13	41	41	21	9
	9	56	----	56	0	0	0	1	23	56	56	50	3
	9	9	----	9	3	4	2	0	1	9	8	4	0
	2	20	----	20	16	15	15	20	17	20	20	15	20
	Total	----	----	29	19	19	17	20	18	29	28	19	20
Pig	9	----	28	28	2	21	3	27	1	28	28	28	27
	2	----	28	28	27	24	28	28	28	28	28	28	28
	Total	----	----	56	29	45	31	55	29	56	56	56	55

\*Data of wild rabbits were previously described (Sánchez del Rey et al., 2013).

**Table 2**  
Virulence-associated gene profiles (VP) and MLST data of the *S. suis* isolates examined in this study.

Cluster	VP	N° isolates	Number of isolates (%)					ST* (n° of isolates)
			Pigs	Wild animals	Serotype 2	9	Tonsil	
A	1	15	1 (1.2)	14 (14.4)		15 (11.3)	14 (11.6)	206 (2), 207 (1), 209 (1), 210 (1), 275 (1), 285 (1), 284 (5), 278 (1), 293 (1), 213 (1)
	2	2		2 (2.1)		2 (1.5)	2 (1.7)	210 (1), 211 (1)
	3	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (0.8)	295 (1)
	4	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (0.8)	364 (1)
	5	5		5 (5.2)		5 (3.8)	4 (3.3)	358 (1), 359 (1), 215 (1), 361 (1), 397 (1)
	6	4		4 (4.1)		4 (3)	3 (2.5)	274 (1), 284 (1), 276 (1), 280 (1)
	7	46	3 (3.5)	43 (44.3)		46 (34.6)	46 (38)	209 (1), 212 (3), 214 (4), 216 (27), 217 (1), 269 (1), 271 (1), 273 (1), 279 (1), 283 (1), 291 (1), 292 (2), 396 (2)
	8	22		22 (22.7)		22 (16.5)	22 (18)	216 (13), 217 (7), 362 (1), 297 (1)
	9	2		2 (2.1)		2 (1.5)	1 (0.8)	277 (1), 208 (1)
	10	2		2 (2.1)		2 (1.5)	2 (1.7)	272 (1), 284 (1)
	11	1		1 (1)		1 (0.8)	1 (0.8)	284 (1)
	12	1		1 (1)	1 (2)			281 (1)
	13	2	2 (2.4)		2 (4.1)		2 (1.7)	1 (1), 56 (1)
B	14	2	2 (2.4)		2 (4.1)		2 (1.7)	56 (2)
	15	1	1 (1.2)			1 (0.8)		123 (1)
	16	17	17 (20)			17 (12.8)	17 (27.9)	123 (11), 125 (6)
	17	7	7 (8.2)			7 (5.3)	7 (11.5)	123 (4), 125 (3)
	18	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (1.6)	16 (1)
	19	1		1 (1)		1 (0.8)	1 (0.8)	363 (1)
	20	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (0.8)	364 (1)
	21	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (0.8)	366 (1)
	22	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (0.8)	368 (1)
	23	1	1 (1.2)			1 (0.8)		367 (1)
	24	1	1 (1.2)			1 (0.8)	1 (1.6)	123 (1)
	25	1	1 (1.2)		1 (2)		1 (0.8)	1 (1)
	26	29	29 (34.1)		29 (59.2)		20 (32.8)	1 (27), 294 (1), 365 (1)
	27	4	4 (4.7)		4 (8.2)		3 (4.9)	1 (4)
	28	1	1 (1.2)		1 (2)		1 (1.6)	1 (1)
	29	7	7 (8.2)		7 (14.3)		3 (2.5)	124 (1), 1 (6)
	30	1	1 (1.2)		1 (2)		1 (0.8)	1 (1)
	31	1	1 (1.2)		1 (2)		1 (0.8)	1 (1)
Total	31	182	85	97	49	133	121	48 (182)

\*MLTS data of wild rabbit and wild boar *S. suis* isolates were previously described (Sánchez del Rey et al., 2013; Sánchez del Rey et al., 2014)



**Fig 1.** Dendrogram showing the genetic relatedness among the virulence genetic profiles of *S. suis* isolates based on UPGMA cluster analysis. 182 *S. suis* isolates were classified into 31 genotypes by PCR. Gray boxes indicate gene detection by PCR. White boxes indicate that genes were not detected by PCR. S, M and L, indicate variants of the *sao* gene detected. s and \*, indicate variants of the *mrp* gene detected.

## Capítulo IV

### Discusión

---



*S. suis* es un patógeno de especial relevancia en la industria porcina, debido a su elevada prevalencia y a las graves pérdidas económicas que origina derivadas de los diversos procesos clínicos que produce, como meningitis, septicemias, artritis o proceso respiratorios (Gottschalk, 2012). Además, desde el punto de vista de Salud Pública, *S. suis* es un agente zoonótico y se considera un patógeno emergente como consecuencia del aumento en el número de casos clínicos en el hombre (Gottschalk y col., 2010). Aunque la mayor parte de estos casos suelen ser esporádicos, generalmente asociados a personas en contacto con cerdos o productos derivados de estos (Taipa y col., 2008; Wertheim y col., 2009), también es responsable de importantes brotes epidémicos como los acontecidos en China en los últimos años (Ye y col., 2006; Yu y col., 2006).

La mayoría de los estudios de caracterización de *S. suis* se han realizado en cerdos que en términos generales podríamos denominar como “cerdo blanco” y que incluiría todas las razas y cruces que se explotan habitualmente en condiciones de cría intensiva (Wisselink y col., 2000; Vela y col., 2003; Blume y col., 2009; Hoa y col., 2011). Sin embargo, no hay datos, o estos son muy limitados, respecto a la distribución y características de las poblaciones de *S. suis* en otros posibles hospedadores y que son necesarios para conocer el posible papel que estos pueden representar en la epidemiología de este patógeno. Un ejemplo sería el cerdo ibérico, una raza típica española cuyo sistema de producción (montanera) está altamente adaptado al ecosistema mediterráneo y en el cual los animales se crían al aire libre alimentándose exclusivamente de bellotas y hierba en la dehesa (Capítulo I, apartado 2.1.1.). Debido a la gran calidad de los productos de estos animales como el jamón ibérico y a la demanda creciente de los mismos, existe una tendencia a la cría de estos animales en condiciones intensivas (cebo). Sin embargo, a pesar de la importancia económica y del fuerte crecimiento de este sector dentro de la producción ganadera española (Cava y col., 1997; López-Bote, 1998), no existen estudios sobre la distribución y caracterización molecular de *S. suis* en estos animales.



La fauna silvestre desempeña un papel esencial en el mantenimiento y la diseminación de determinados patógenos que afectan, no sólo a otros animales (silvestres o domésticos), sino también al hombre (Gortázar y col., 2007; Meng y col., 2009, Gortázar y col., 2011). A pesar de ello, el papel de los animales silvestres en la epidemiología de ciertos patógenos, como *S. suis*, es poco conocido. En este sentido, sólo existe un estudio que haya investigado las características de aislados de *S. suis* en jabalíes, el cual fue realizado en Alemania (Baums y col., 2007). En dicho estudio se señaló que estos animales pueden ser portadores de cepas de *S. suis* potencialmente patógenas para el hombre. El jabalí es una de las especies silvestres cuya población se encuentra actualmente en expansión, tanto en España como en el resto de Europa (Sáez-Royuela y Tellería, 1986; Artois y col., 2002), siendo actualmente el ungulado silvestre con mayor distribución en la Península Ibérica. Este incremento de las poblaciones facilita el posible contacto con otros animales domésticos, principalmente los que se crían al aire libre, lo que representa un riesgo en la transmisión de la enfermedad. Por otra parte, el conejo silvestre es otra de las especies cinegéticas de importancia en nuestro país, tanto por su importancia ecológica como por su relevancia como especie de caza menor (Delibes-Mateos y col., 2008; Gálvez y col., 2009), y que tiene también un papel importante como reservorio de patógenos animales y humanos (Cutler y col., 2010; Maio y col., 2011). A pesar de la relevancia ecológica y cinegética de ambas especies silvestres en España no se disponía de información relativa a la presencia y distribución de *S. suis* en las mismas.

Por tanto, en el presente trabajo de Tesis Doctoral investigamos la presencia de *S. suis* en el cerdo ibérico, el jabalí y el conejo silvestre. Además, se realizó la caracterización de los aislados con el fin de investigar la relación presente entre los aislados procedentes de dichas poblaciones y los de cerdo blanco, para determinar el papel que pueden desempeñar en la epidemiología de este patógeno. Se caracterizaron principalmente aislados tonsilares dado que, de los distintos órganos que se muestrearon, fueron las tonsilas donde se obtuvieron los mayores porcentajes de recuperación de *S. suis* (Material y Métodos, Capítulos III.I, III.II y III.III). Para la caracterización de este microorganismo, determinamos el serotipo

de los aislados y realizamos la caracterización genética mediante diferentes técnicas moleculares. Así, además de las técnicas PFGE y MLST, ampliamente utilizadas para la caracterización de este patógeno (King y col., 2002; Vela y col., 2003; Tian y col., 2004; Chang y col., 2006; Ye y col., 2006; Luey y col., 2007; Marois y col., 2007; Blume y col., 2009; Fittipaldi y col., 2011; Hoa y col., 2011; Schultsz y col., 2012; Wang y col., 2013), también se emplearon las técnicas MLVA y el genotipado basado en los perfiles de determinados genes (presencia/ausencia) asociados con la virulencia de este patógeno. Estas dos últimas técnicas han mostrado ser de gran utilidad en la caracterización de diferentes microorganismos (Gilbert y col., 2006; Elberse y col., 2011; Haguenoer y col., 2011; Ferreira y col., 2012; Tien y col., 2012; Elemfareji y col., 2013; Nowrouzian y col., 2013), pero la información disponible referente a su utilidad en *S. suis* es escasa.

*S. suis* se aisló aproximadamente de la mitad (48,4%, Capítulo III.II) de las tonsilas de los cerdos ibéricos estudiados, resultado que demuestra la amplia distribución de este microorganismo en la población de cerdo ibérico. Este resultado coincide con lo descrito en estudios previos que han analizado su presencia en las tonsilas en el cerdo blanco (Arends y col., 1984; Breton y col., 1986; Brisebois y col., 1990; Marois y col., 2007; Hoa y col., 2011). No obstante, el porcentaje de cerdos ibéricos portadores de *S. suis* podría haber sido mayor si en lugar de utilizar el cultivo en medio Agar Columbia CNA para su detección, se hubieran empleado técnicas moleculares que presentan una mayor sensibilidad (Marois y col., 2007). La cuarta parte de los aislados tonsilares de *S. suis* pertenecieron a los serotipos 1, 2 y 9 (25%, Tabla 1, Capítulo III.II), serotipos habitualmente detectados en la población de cerdo blanco de nuestro país (Luque y col., 1999; Wisselink y col., 2000; Tarradas y col., 2001a; Vela y col., 2003; Tarradas y col., 2004). Además, se identificaron 19 serotipos adicionales mediante la técnica de coaglutinación (Tabla 1, Capítulo III.II), resultado que demuestra la elevada diversidad de la población de *S. suis* en el cerdo ibérico, y que es bastante similar a la encontrada en el cerdo blanco de nuestro país (Luque y col., 1999; Tarradas y col., 2001a). El estudio incluyó animales criados tanto en montanera como en cebo (Capítulo III.II) para analizar el posible efecto que el sistema de explotación

(extensivo/intensivo) pudiera tener en la población de este patógeno. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento de *S. suis* entre los cerdos de montanera y cebo (51,4% y 45,1%, respectivamente (Capítulo III.II). Este dato, junto al hecho de que no se encontraran diferencias en la diversidad de serotipos detectados en ambos grupos de cerdos (Tabla 1, Capítulo III.II), sugiere que el sistema de explotación no afectaría a la capacidad de colonización de *S. suis*. En este estudio se incluyeron también aislados clínicos de *S. suis*, todos ellos procedentes de cerdo ibérico de cebo (Material y Métodos, Capítulo III.II). La mayoría de los aislados clínicos fueron clasificados como serotipo 2, que coincide con el serotipo más prevalente y responsable de la mayoría de los casos clínicos en el cerdo blanco en nuestro país (Prieto y col., 1993; Luque y col., 1999; Wisselink y col., 2000; Tarradas y col., 2001a).

En relación con las dos especies silvestres estudiadas, *S. suis* se aisló del 39,1% de los 425 jabalíes estudiados de las regiones del Noreste y Centro de España (Estudio 2, Capítulo III.I). Aunque este porcentaje fue inferior al obtenido en el estudio realizado en Alemania (92%; Baums y col., 2007), los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman el papel de estos animales como reservorio de *S. suis*. El porcentaje de conejos silvestres portadores de *S. suis* fue asimismo relativamente elevado (33,3%) (Estudio 1, Capítulo III.I). Este dato es especialmente significativo si consideramos que *S. suis* es un patógeno típico del ganado porcino, aunque haya sido aislado de manera esporádica a partir de otras especies animales, como el perro, el gato, rumiantes domésticos o algunas especies de aves (Devriese y col., 1990, 1994; Hommezy y col., 1988; Muckle y col., 2010; Roels y col., 2009). Este estudio representa la primera descripción de aislamiento de *S. suis* en conejos silvestres, animales que representan un reservorio de este patógeno no descrito previamente. El serotipo 9 fue el más frecuente entre los aislados de jabalí (12,5%) (Tabla 1, Estudio 2, Capítulo III.I). Este resultado coincide con lo descrito previamente por Baums y col. (2007) respecto a la mayor prevalencia de este serotipo entre los aislados de *S. suis* procedentes de esta especie animal. El serotipo 9 fue también el mayoritario (86,2%) entre los aislados de conejo silvestre (Estudio 1, Capítulo III.I). Sin embargo, en ambas especies silvestres el serotipo 2 fue

minoritario (0,3 y 0% en jabalíes y conejos, respectivamente). Varios estudios realizados en nuestro país, han destacado el serotipo 2 como el más prevalente entre los aislados tonsilares porcinos (Luque y col., 1999; Tarradas y col., 2001a). Por tanto, la marcada predominancia del serotipo 9 sobre el serotipo 2 entre los aislados procedentes de jabalí y conejo silvestre sugiere la existencia de características diferentes entre la población de *S. suis* procedente de estos animales silvestres y la presente en el ganado porcino.

Estos resultados suscitaron nuestro interés por profundizar en el conocimiento de este patógeno, efectuando la caracterización molecular de los aislados de *S. suis* procedentes de las dos especies silvestres estudiadas así como de cerdo ibérico. Los estudios de caracterización genética se centraron fundamentalmente en los aislados de los serotipos 2 y 9, responsables de la mayor parte de procesos clínicos en el cerdo blanco en España (Luque y col., 1999; Wisselink y col., 2000; Vela y col., 2003; Tarradas y col., 2004). En los aislados de ganado porcino, las cuatro técnicas utilizadas (PFGE, MLST, MLVA y la técnica basada en la detección de genes asociados a la virulencia) presentaron un elevado poder de caracterización, siendo capaces de tipificar todos los aislados y por tanto podemos considerarlas válidas como métodos de tipificación (Maslow y col., 1993). Con respecto al poder discriminatorio (D), característica clave en las herramientas de caracterización molecular (Arbeit, 1995), la técnica PFGE fue la más discriminatoria (D=0,96) y MLST fue la técnica que mostró el poder de discriminación más bajo (D=0,67). Estos resultados coinciden con estudios previos que demuestran tanto el gran poder discriminatorio de la técnica PFGE, como las limitaciones en este sentido de la técnica MLST (Vela y col., 2003; Blume y col., 2009; Kerdsin y col., 2009; Li y col., 2010; Fittipaldi y col., 2011). A pesar del gran poder de discriminación de PFGE, es una técnica laboriosa, de interpretación subjetiva y que no permite la comparación de resultados entre laboratorios (Vázquez y Berrón, 2004; Ye y col., 2006; Sabat y col., 2013). Por otra parte, la técnica MLST, aunque es menos discriminatoria que PFGE aplicada a la caracterización de *S. suis* (Blume y col., 2009; Kerdsin y col., 2009; Li y col., 2010; Fittipaldi y col., 2011), permite la comparación de datos entre laboratorios a través

de bases de datos *on-line* (King y col., 2002) y se considera de elección para los estudios de evolución genética de poblaciones microbianas a largo plazo.

La técnica de MLVA utilizada en el presente trabajo para la caracterización de *S. suis* está basada en la utilización de 9 VNTR conforme a lo publicado por Li y col. (2010). Sin embargo, durante la puesta a punto de la técnica comprobamos que uno de los VNTR propuestos (TR9) mostraba un gran polimorfismo, aportando un excesivo poder de discriminación que dificultaba la interpretación de los resultados. En consecuencia, tras efectuar el estudio de los VNTR presentes en el genoma de *S. suis*, decidimos sustituirlo por otro que habíamos evaluado (SSTR18; Material y Métodos, Capítulo III.II). Por otra parte, estudios previos han mostrado que la determinación de los perfiles genéticos basados en la detección de determinados genes de virulencia es de utilidad para la caracterización de ciertos microorganismos (Ferreira y col., 2012; Elemfareji y col., 2013; Nowrouzian y col., 2013). Concretamente en *S. suis*, este tipo de estudios se han basado, en la mayoría de los casos, en la presencia de los tres factores tradicionalmente asociados a la virulencia en este patógeno: la proteína liberada por muramidasa, el factor extracelular y la suilisina, o sus respectivos genes (*mmp*, *epf* y *shy*, respectivamente) (Rehm y col., 2007; Princivalli y col., 2009; Wei y col., 2009; Hoa y col., 2011; Wang y col., 2013; Zhu y col., 2013). No obstante, existen escasos estudios que hayan evaluado la eficacia de otros genes asociados a la virulencia en la caracterización de *S. suis* (Feng y col., 2007; Takamatsu y col., 2009; Wang y col., 2012). Por tanto, en el presente trabajo de investigación, la caracterización de *S. suis* fue realizada en base a los perfiles de genes asociados a la virulencia, incluyendo los clásicos, *mmp*, *epf* y *shy*, y otros de reciente descripción (*sao*, *impdh*, *covR*, *srtA*, *dpp* y *dltA*) (Capítulo III.III).

Las técnicas MLVA y la detección de genes asociados a la virulencia presentaron índices de discriminación de  $D=0,81$  y  $D=0,80$ , respectivamente. Aunque son técnicas ligeramente menos discriminatorias que la técnica PFGE, poseen una serie de ventajas como la rapidez y sencillez de realización e interpretación, un coste asequible al ser métodos basados en la PCR, o la posibilidad de elaborar bases de datos (fundamentadas en perfiles asociados a

códigos numéricos basados en el número de repeticiones en el caso de la técnica MLVA o en la presencia/ausencia de los distintos factores asociados a la virulencia), lo cual facilita la comparación e intercambio de información entre laboratorios. En consecuencia, tanto la técnica MLVA como la determinación de perfiles de genes asociados a virulencia constituyen herramientas moleculares adecuadas para la caracterización de *S. suis*.

Con independencia de las diferencias en su poder de discriminación, los resultados de caracterización genética obtenidos por las cuatro técnicas resultaron bastante congruentes. Los aislados de *S. suis* de cerdo ibérico presentaron una diversidad genética moderada mediante PFGE (GD=0,48). La condición clínica de los animales (enfermos o portadores) influyó en la diversidad genética de los aislados de *S. suis*. Así, los aislados tonsilares mostraron una diversidad genética dos veces superior a la de los aislados clínicos (GD=0,58 y GD=0,27, respectivamente). Este resultado corroboró la mayor diversidad genética presente entre los aislados tonsilares de *S. suis* observada en estudios previos realizados en el cerdo blanco (Beaudoin y col., 1992a; Allgaier y col., 2001; Berthelot-Hérault y col., 2002). La comparación entre aislados clínicos y tonsilares procedentes de cerdo, tanto blanco como ibérico, mostró que algunos aislados (de ambos orígenes) presentaron los mismos perfiles genéticos (pulsotipos 5, 9 y 10, Figura 1, Capítulo III.II), lo cual sugiere el carácter potencialmente patógeno de dichas cepas tonsilares y corrobora la importancia que los animales portadores pueden llegar a tener en la transmisión de la enfermedad, tal y como se ha sugerido previamente (Luque y col., 1999; Berthelot-Hérault y col., 2000; Luque y col., 2010; Hoa y col., 2011). El hecho que algunos aislados clínicos y tonsilares de serotipo 2 presentasen también el mismo perfil de genes de virulencia (Tabla 2, Capítulo III.III) apoya igualmente el papel de las tonsilas como reservorio de cepas virulentas de *S. suis*. La diversidad genética hallada entre los aislados porcinos de *S. suis* se confirmó también mediante la técnica MLVA, por la cual se detectaron 23 perfiles diferentes (Figura 2, Capítulo III.II) y la técnica MLST que clasificó los aislados en 16 perfiles alélicos diferentes (Figura 1, Capítulo III.II; Figura 8).

Los aislados de *S. suis* de jabalí mostraron, cuando fueron caracterizados por PFGE, una diversidad genética mayor a la observada en el ganado porcino (GD=0,94) con 47 pulsotipos diferentes, la mayoría de los cuales estuvo representado por un único aislado (Figura 1, Estudio 2, Capítulo III.I; Figura 9). Al igual que con los aislados porcinos, la diversidad genética de los aislados de jabalí se confirmó mediante MLST, detectándose 37 ST, todos ellos descritos por primera vez en este estudio (Figura 1 y Material Suplementario, Estudio 2, Capítulo III.I; Figura 8). La diversidad genética hallada en el presente estudio entre los aislados tonsilares de *S. suis* de cerdo y jabalí es congruente con la heterogeneidad de la población de *S. suis* presente en las tonsilas (Allgaier y col., 2001; Berthelot-Hérault y col., 2002; Martínez y col., 2002). Por este motivo, resultó especialmente llamativa la baja diversidad genética encontrada entre los aislados tonsilares de conejo silvestre mediante el análisis por PFGE (Estudio 1, Capítulo III.I). Los 56 aislados de *S. suis* de serotipo 9 mostraron únicamente 5 pulsotipos diferentes (GD=0,09; Tabla 1, Estudio 1, Capítulo III.I; Figura 9), y la mayoría de ellos (71,4%) pertenecieron a dos pulsotipos que estuvieron presentes en el 68,2 % de los conejos silvestres. Del mismo modo, estos aislados se asignaron únicamente a 3 nuevos perfiles alélicos (ST216, ST217 y ST284), uno de los cuales (ST216) incluyó aproximadamente las tres cuartas partes (71,4%) de los aislados (Tabla 1, Estudio 1, Capítulo III.I; Figura 8). Esta diversidad genética inusualmente baja entre los aislados tonsilares de *S. suis* pudiera estar relacionada con el hecho de que los conejos procedían de una área geográfica relativamente limitada (Monte del Pardo) o porque se tratasen de clones que se encuentren adaptados a esta especie animal, tal y como ha sido descrito para otras especies bacterianas (Sorensen y col., 2010; Chrzastek y col., 2012). Sin embargo, para confirmar esta hipótesis será necesario realizar estudios posteriores que incluyan un mayor número de aislados de conejo procedentes de otras áreas geográficas.

La mayoría de los aislados de jabalí y conejo silvestre fueron clasificados como serotipo 9 (Capítulo III.I), por lo que la comparación de las características genéticas entre los aislados de serotipo 2 y 9 sólo pudo realizarse con los aislados procedentes de ganado porcino (Capítulo III.II). Los datos de PFGE confirmaron la

distribución clonal por serotipo, acorde con lo descrito previamente (Vela y col., 2003; Blume y col., 2009). Así, todos los aislados de serotipo 2, tanto de cerdo ibérico como blanco, se incluyeron en un mismo grupo genético mediante PFGE que fue distinto al que incluyó el 75% de los aislados de serotipo 9 (Figura 1, Capítulo III.II). Los dendrogramas basados en los perfiles de MLVA (Figura 2, Capítulo III.II) y de genes asociados a la virulencia (Tabla 2, Capítulo III.III), confirmaron estas diferencias genéticas entre los aislados de ambos serotipos. Respecto a los perfiles de genes asociados a la virulencia (VP), ninguno de los aislados de serotipo 2 mostró un perfil en común con los aislados de serotipo 9. Asimismo, el 45,9% de los aislados porcinos de serotipo 9 fueron asignados al perfil VP16 (*epf*-/*sly*+/*mrp*-/*saoL*/*impdb*-/*covR*+/*srtA*+/*dpp*+/*dltA*+), mientras que el 60,4% de los aislados de serotipo 2 presentaron un perfil diferente, el perfil VP26 (*epf*+/*sly*+/*mrp*+/*saoM*/*impdb*+/*covR*+/*srtA*+/*dpp*+/*dltA*+ (Tabla 2 y Figura 1, Capítulo III.III). En este mismo contexto, resultó interesante la asociación que encontramos entre la variante del gen *sao* (uno de los genes utilizados para la determinación de los perfiles de genes asociados a la virulencia; Capítulo III.III) y el serotipo 2 o 9 de *S. suis*. La gran mayoría de los aislados de serotipo 9 en los que se detectó dicho gen, presentaron la variante larga (*saoL*) (89,7%), mientras que los aislados de serotipo 2 presentaron la variante mediana (*saoM*) de este gen (98%). Las diferencias genéticas entre los aislados de los serotipos 2 y 9 también se pudieron confirmar mediante MLST. La mayoría de los aislados porcinos de serotipo 2 se asignaron al perfil alélico ST1 (87,5%), mientras que los aislados de serotipo 9 se asignaron a los perfiles alélicos ST123 y ST125 (72,2%).

Se realizó la comparación de las características genéticas de los aislados de los principales serotipos encontrados en el cerdo ibérico, jabalí y conejo silvestre con los procedentes de cerdo blanco. Los aislados de *S. suis* de cerdo ibérico fueron bastante similares a los de cerdo blanco, principalmente en el caso de los aislados clínicos. Todos los aislados clínicos de serotipo 2, tanto de cerdo ibérico como cerdo blanco, a excepción de un aislado, fueron asignados al perfil alélico ST1 (Figura 2, Capítulo III.II). Dicho clon es el responsable de la mayoría de los casos clínicos producidos por este serotipo en Europa (King y col., 2002; Blume y col.,



2009; Schultsz y col., 2012). El único aislado clínico de serotipo 9 de cerdo ibérico fue asignado al perfil alélico ST123 y los aislados clínicos de cerdo blanco de este serotipo fueron asignados, a excepción de un aislado, a los perfiles alélicos ST123 o ST125 (perfiles que sólo difieren en un alelo), resultado que coincide con lo descrito previamente en España (Blume y col., 2009). La comparación de los aislados tonsilares de *S. suis* de cerdo ibérico y blanco es algo más complicada. Más de la mitad de los aislados tonsilares de serotipo 2 (54,5%) y todos los aislados tonsilares de serotipo 1 de cerdo ibérico fueron asignados también al perfil ST1 (Figura 2, Capítulo III.II). Este resultado es similar a la información disponible en la base de datos de MLST de *S. suis*, la cual muestra que aproximadamente la mitad de los aislados tonsilares de serotipo 2 pertenecen al genotipo ST1 (<http://ssuis.mlst.net>). Del mismo modo, algunos estudios realizados en animales portadores señalan que la mayor parte de los aislados tonsilares de este serotipo son asignados al ST1 (Hoa y col., 2011; Wang y col., 2013). La amplia distribución del genotipo ST1 entre los aislados tonsilares de cerdo podría estar relacionada con la rápida propagación de dicho clon como responsable de gran parte de los casos clínicos producidos por *S. suis* (King y col., 2002; Rehm y col., 2007; Blume y col., 2009; Princivalli y col., 2009; Schultsz y col., 2012). El único aislado tonsilar de serotipo 7 de cerdo ibérico fue asignado al perfil alélico ST24, detectado también en el cerdo blanco en España (<http://ssuis.mlst.net>). Respecto a las cepas de serotipo 9 de cerdo ibérico, ninguno de los aislados perteneció a los ST detectados entre las cepas clínicas, asignándose a nuevos perfiles alélicos descritos en el presente estudio (Figura 2 y Tabla Suplementaria, Capítulo III.II; Figura 8).

Se han observado diferencias en la presencia de distintos genes relacionados con la virulencia entre aislados de cerdo y jabalí en microorganismos patógenos como *Escherichia coli* (Schierack y col., 2013). En el presente trabajo de investigación, la comparación de las características genéticas de los aislados de *S. suis* procedentes de las tres especies animales estudiadas mostró asimismo claras diferencias entre los aislados porcinos y los de jabalí y conejo silvestre. Así, mediante PFGE los aislados de cerdo no presentaron ningún pulsotipo en común con los aislados procedentes de ambas especies silvestres (Figura 9).

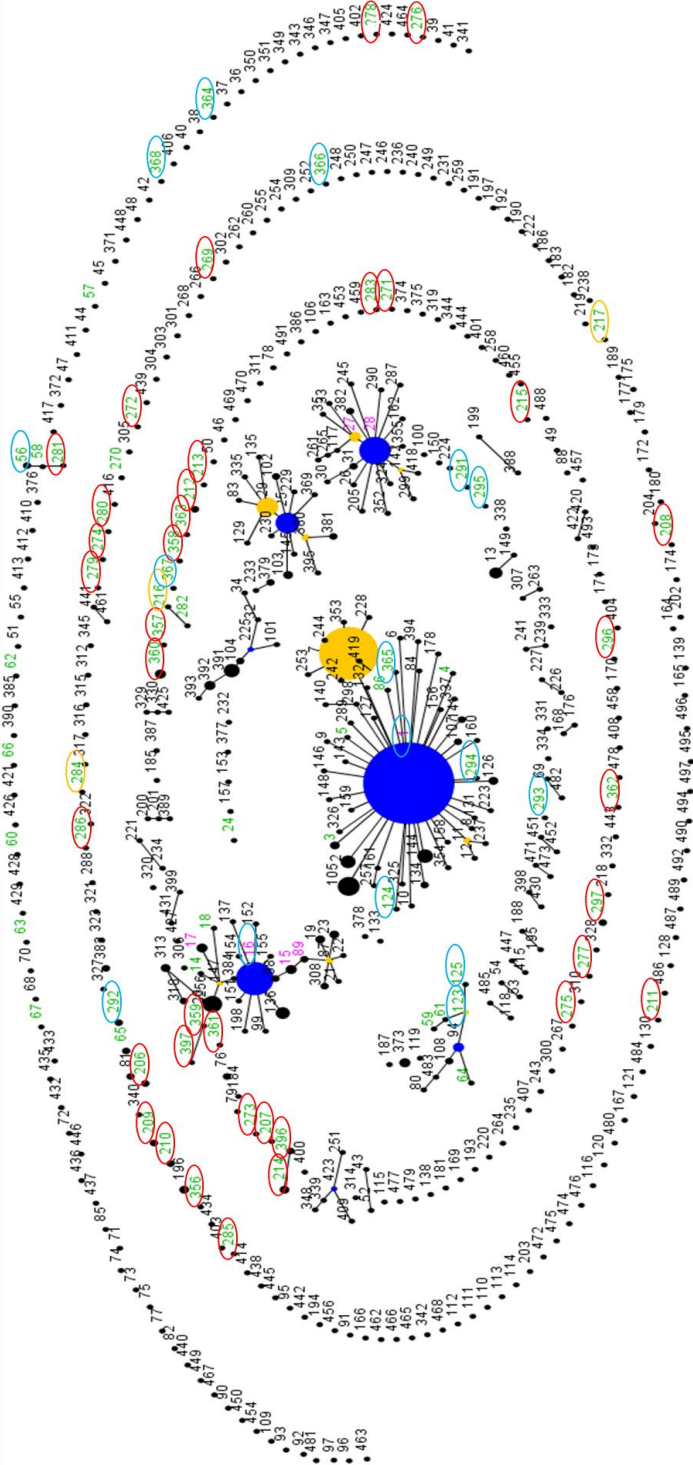


Figura 8. Análisis de la estructura poblacional de *S. suis* mediante el análisis eBurst (<http://ssuis.mlst.net>, 2014). Los ST que encuentran enmarcados en círculos se corresponden con ST descritos en los trabajos de la presente Tesis Doctoral, procedentes de las diferentes especies animales, jabalí (rojo), conejo silvestre (amarillo) y cerdo (azul).

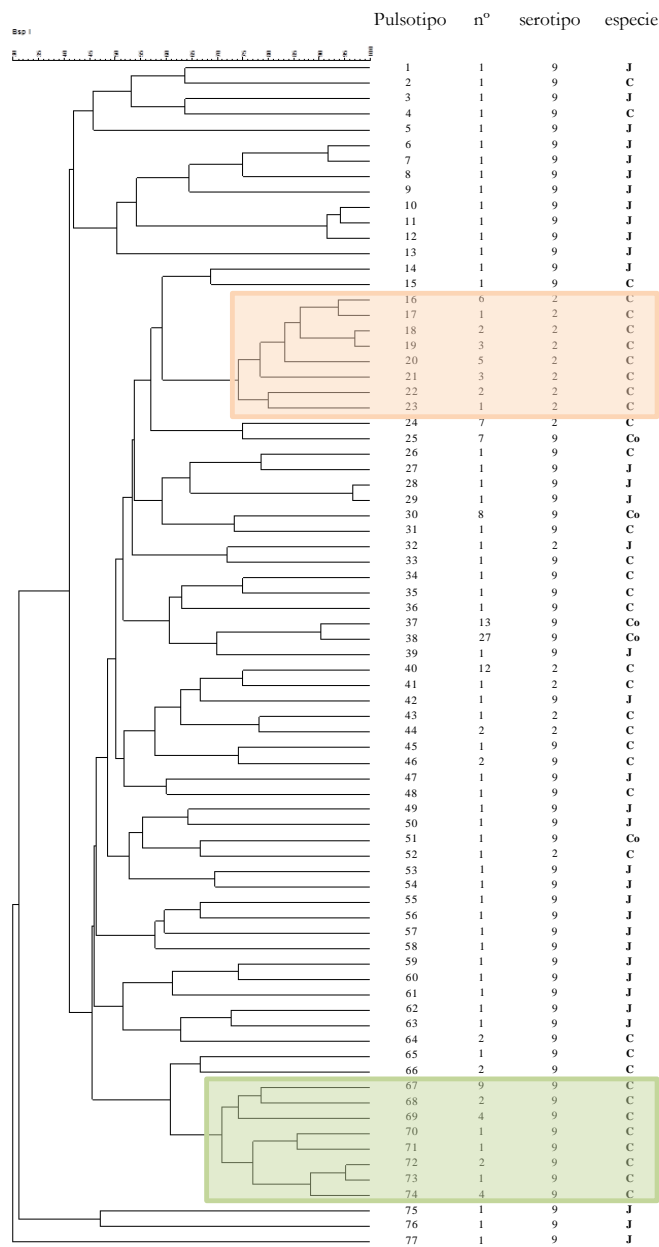


Figura 9. Dendrograma que muestra la relación genética de los aislados pertenecientes a los serotipo 2 y 9 procedentes de cerdo (C), jabalí (J) y conejo silvestre (Co) resultado del análisis UPGMA a partir de los patrones de restricción obtenido por PFGE. Los recuadros muestran la agrupación de 60% de los aislados porcinos de acuerdo con el serotipo.

Del mismo modo, mediante MLST, los nuevos perfiles alélicos asignados a los distintos aislados de jabalí y conejo silvestre no presentaron relación genética con los perfiles alélicos mayoritarios (ST1, ST123 y ST125) presentes en la población porcina (Figura 8).

Estas diferencias también se detectaron cuando se realizó el estudio de los genes asociados a la virulencia en *S. suis*. De los 9 genes investigados, cinco de ellos (*epf*, *shy*, *mmp*, *sao* y *dltA*) no se detectaron en la mayoría de los aislados de jabalí y conejo silvestre, pero estuvieron presentes en la mayoría de los aislados de cerdo (Tabla 1, Capítulo III.III). En base a la presencia o ausencia de los genes investigados, los aislados de *S. suis* se clasificaron en 31 perfiles. De ellos, únicamente dos fueron detectados tanto en el cerdo como en las especies silvestres (Tabla 2, Capítulo III.III), presentando el 95,3% de los aislados porcinos perfiles diferentes a los observados entre los aislados procedentes de las especies silvestres investigadas. Asimismo, los perfiles detectados más frecuentemente entre los aislados de *S. suis* en el cerdo y las especies silvestres fueron diferentes. Los perfiles VP16 y VP26 fueron los más prevalentes entre los aislados de cerdo, mientras que los perfiles VP7 y VP8 fueron los más frecuentes entre los aislados procedentes de las especies silvestres (Tabla 2, Capítulo III.III). Estos perfiles estuvieron asociados con determinados genotipos detectados por MLST (Tabla 2, Capítulo III.III). Así el perfil VP26 presente en la mayoría de los aislados clínicos (71,4%) y aproximadamente la mitad (45%) de los aislados tonsilares de serotipo 2 de cerdo, estuvo asociado al perfil alélico ST1. Más de la mitad de los aislados clínicos de cerdo de serotipo 9 (60,7%) presentaron el perfil VP16, el cual estuvo asociado a los genotipos ST123 y ST125. Los perfiles VP7 y VP8, mayoritarios entre los aislados de las especies silvestres, estuvieron asociados al perfil alélico ST216. En consecuencia, los resultados de caracterización molecular tanto por PFGE, MLST y perfiles de genes de virulencia, han puesto de manifiesto que la población de *S. suis* procedente tanto de jabalí como de conejo silvestre no se encuentra relacionada con la presente en el ganado porcino. Estas diferencias podrían ser de utilidad en estudios epidemiológicos de *S. suis*.

Los perfiles asignados a las cepas clínicas de cerdo presentaron claras diferencias en cuanto al número de genes asociados a la virulencia que fue detectado. Los aislados de *S. suis* que presentaron el perfil VP26 presentaban todos los genes de virulencia estudiados, mientras que los aislados de *S. suis* que mostraron el perfil VP16 se caracterizaron por la falta de 3-4 de los genes (Figura 1, Capítulo III.III). Estos datos indican que la ausencia de uno o varios de los genes investigados no implica necesariamente una falta de virulencia y por lo tanto, aunque puedan desempeñar un cierto papel (Fittipaldi y col., 2012), ninguno debería considerarse esencial en la virulencia de *S. suis*. En consecuencia, aunque la detección de los genes asociados a la virulencia constituye, como comentamos anteriormente, una técnica útil para la caracterización de *S. suis*, no sería una herramienta adecuada para evaluar la virulencia de los aislados de este patógeno.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han permitido esclarecer varios aspectos sobre la epidemiología de *S. suis*. Así, se confirma el papel del jabalí como reservorio de *S. suis* y se describe por primera vez el papel del conejo silvestre como un nuevo reservorio de este patógeno. Sin embargo, la caracterización molecular de los aislados de ambas especies silvestres indica que estos no están relacionados genéticamente con los clones habitualmente detectados en el cerdo, tanto en España como en el resto de países europeos. Por lo tanto, ambas especies no representan un riesgo potencial para la cabaña ganadera porcina de nuestro país.

## Capítulo V

### Conclusiones

---



## Conclusiones

1. El conejo silvestre constituye un reservorio de *Streptococcus suis* no descrito previamente. Asimismo, se confirma el papel del jabalí como reservorio de este patógeno.

2. La caracterización molecular de los aislados de *Streptococcus suis* evidencia la existencia de características genéticas diferentes entre el ganado porcino y las dos especies silvestres estudiadas (jabalí y conejo silvestre), lo cual implica que estos animales no representarían un riesgo potencial para la cabaña ganadera porcina.

3. En el cerdo ibérico, los casos clínicos asociados a los serotipo 2 y 9 de *Streptococcus suis* están producidos por los mismos clones (ST1 y ST123, respectivamente) descritos en el cerdo blanco de España.

4. No se encontraron diferencias ni en la frecuencia de animales portadores ni en la diversidad de serotipos encontrados entre el cerdo ibérico y blanco, lo que sugiere que la capacidad de colonización de *Streptococcus suis* no se vería afectada por el sistema de explotación.

5. Independientemente de la técnica de caracterización molecular utilizada, los aislados de *Streptococcus suis* de los serotipos 2 y 9 constituyeron poblaciones genéticas diferentes.

6. Las técnicas MLVA y la determinación de perfiles genéticos basados en la detección de genes asociados a la virulencia han demostrado ser herramientas moleculares adecuadas para la caracterización de *Streptococcus suis*.

7. La determinación de los perfiles de los genes de virulencia estudiados, si bien representa una técnica útil para la caracterización de *Streptococcus suis*, no resulta apropiada para predecir el carácter virulento de las cepas de este patógeno.





## Capítulo VI

### Bibliografía

---





- Arends JP, Zanen HC. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Reviews of Infectious Diseases* **10**: 131-137.
- Arends JP, Hartwig N, Rudolphy M, Zanen HC. 1984. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. *Journal of Clinical Microbiology* **20**: 945-947.
- Artois M, Depner KR, Guberti V, Hars J, Rossi S, Rutili D. 2002. Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Revue Scientifique et Technique* **21**: 287-303.
- Bahloul H, Mofredj A, Mrabet A, Gineyt G, Rousselier P. 2008. *Streptococcus suis* meningitis after oral contamination?. *Medecine et Maladies Infectieuses* **38**: 281-282.
- Baums CG, Valentin-Weigand P. 2009. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Animal Health Research Reviews* **10**: 65-83.
- Baums CG, Kaim U, Fulde M, Ramachandran G, Goethe R, Valentin-Weigand P. 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity* **74**: 6154-6162.
- Baums CG, Verkuhlen GJ, Rehm T, Silva LM, Beyerbach M, Pohlmeier K, Valentin-Weigand P. 2007. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 711-717.
- Beaudoin M, Harel J, Higgins R, Gottschalk M, Frenette M, MacInnes JI. 1992a. Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with an rDNA probe. *Journal of General Microbiology* **138**: 2639-2645.
- Beaudoin M, Higgins R, Harel J, Gottschalk M. 1992b. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiology Letters* **78**: 111-116.
- Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P. 2004. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cellular Microbiology* **6**: 867-881.
- Berthelot-Hérault F, Morvan H, Keribin AM, Gottschalk M, Kobisch M. 2000. Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Veterinary Research* **31**: 473-479.

- Berthelot-Hérault F, Gottschalk M, Labbe A, Cariolet R, Kobisch M. 2001. Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Veterinary Microbiology* **82**: 69-80.
- Berthelot-Hérault F, Marois C, Gottschalk M, Kobisch M. 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 615-619.
- Berthelot-Hérault F, Gottschalk M, Morvan H, Kobisch M. 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* **69**: 236-240.
- Blume V, Luque I, Vela AI, Borge C, Maldonado A, Domínguez L, Tarradas C, Fernández-Garayzábal JF. 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *International Microbiology* **12**: 161-166.
- Boadella M, Ruiz-Fons JF, Vicente J, Martín M, Segales J, Gortázar C. 2012. Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases* **59**: 395-404.
- Bonifait L, Gottschalk M, Grenier D. 2010. Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters* **311**: 160-166.
- Bonifait L, Grenier D. 2011. The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism. *BMC Microbiology* **11**: 47. doi: 10.1186/1471-2180-11-47.
- Brassard J, Gottschalk M, Quessy S. 2004. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Veterinary Microbiology* **102**: 87-94.
- Breton J, Mitchell WR, Rosendal S. 1986. *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers. *Canadian Journal of Veterinary Research* **50**: 338-341.
- Brisebois LM, Charlebois R, Higgins R, Nadeau M. 1990. Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets. *Canadian Journal of Veterinary Research* **54**: 174-177.

- Cava R, Ruiz J, López-Bote C, Martín L, García C, Ventanas J, Antequera T. 1997. Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science* **45**: 263-270.
- Chang B, Wada A, Ikebe T, Ohnishi M, Mita K, Endo M, Matsuo H, Asatuma Y, Kuramoto S, Sekiguchi H, Yamazaki M, Yoshikawa H, Watabe N, Yamada H, Kurita S, Imai Y, Watanabe H. 2006. Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **59**: 397-399.
- Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M. 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity* **68**: 637-643.
- Chatellier S, Gottschalk M, Higgins R, Brousseau R, Harel J. 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 362-366.
- Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Wang J, Yan J, Yang H, Wang X, Gao GF, Yang R, Wang J, Yu J. 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PloS One* **2**: e315. doi: 10.1371/journal.pone.0000315.
- Chenal-Francisque V, Diancourt L, Cantinelli T, Passet V, Tran-Hykes C, Bracq-Dieye H, Leclercq A, Pourcel C, Lecuit M, Brisse S. 2013. Optimized Multilocus variable-number tandem-repeat analysis assay and its complementarity with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 1868-1880.
- Chrzastek, K., Kuczkowski, M., Wieliczko, A.K., Bednarek, K.J., Wieliczko, A. 2012. Molecular epidemiologic investigation of Polish avian *Pasteurella multocida* strains isolated from fowl cholera outbreaks showing restricted geographical and host-specific distribution. *Avian Diseases* **56**: 529–536.
- Clifton-Hadley FA. 1984. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Veterinary Research Communications* **8**: 217-227.
- Clifton-Hadley FA. 1985. Epidemiology of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Veterinary Annual* **25**: 161-166.

- Clifton-Hadley F, Alexander T. 1991. Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. En: Swine Practice. Boden E (Ed.). Bailliere Tindall, London, pp. 115-126.
- Clifton-Hadley FA, Enright MR. 1984. Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *The Veterinary Record* **114**: 584-586.
- Clifton-Hadley FA, Alexander TJ, Upton I, Duffus WP. 1984. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *The Veterinary Record* **114**: 513-518.
- Clifton-Hadley FA, Alexander TJ, Enright MR. 1986. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2: chance contamination of slaughter pigs. *The Veterinary Record* **118**: 274.
- Cloutier G, D'Allaire S, Martínez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M. 2003. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary Microbiology* **97**: 135-151.
- Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases* **16**: 1-7.
- de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Köckritz-Blickwede M, Baums CG. 2014. *Streptococcus suis* DNase *SsnA* contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology* **160**:385-395.
- de Greeff A, Buys H, van Alphen L, Smith HE. 2002a. Response regulator important in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbial Pathogenesis* **33**: 185-192.
- de Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, Smith HE. 2002b. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity* **70**: 1319-1325.
- de Moor CE. 1963. Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S, and T. *Antonie van Leeuwenhoek* **29**: 272-280.
- Dee SA, Corey MM. 1993. The survival of *Streptococcus suis* on farm and veterinary equipment. *Journal of Swine Health and Production* **1**:17-20.
- Dee SA, Carlson AR, Winkelman NL, Corey MM. 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **203**: 295-299.



- Delibes-Mateos M, Delibes M, Ferreras P, Villafuerte R. 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conservation Biology* **22**: 1106-1117.
- Devriese LA, Sustronck B, Maenhout T, Haesebrouck F. 1990. *Streptococcus suis* meningitis in a horse. *The Veterinary Record* **127**: 68.
- Devriese LA, Ceyssens K, Hommez J, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Veterinary Microbiology* **26**: 141-150.
- Devriese LA, Cruz Colque JI, De Herdt P, Haesebrouck F. 1992. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *The Journal of Applied Bacteriology* **73**: 421-425.
- Devriese LA, Desmidt M, Roels S, Hoorens J, Haesebrouck F. 1993. *Streptococcus suis* infection in fallow deer. *The Veterinary Record* **132**: 283.
- Devriese LA, Haesebrouck F, de Herdt P, Dom P, Ducatelle R, Desmidt M, Messier S, Higgins R. 1994. *Streptococcus suis* infections in birds. *Avian Pathology* **23**: 721-724.
- Dziejman M, Mekalanos JJ. 1995. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. En: Two-Component Signal Transduction. Hoch JA, Silhavy TJ (Eds.). American Society for Microbiology Press, Washington, D. C., pp. 305-317.
- Elberse KE, Nunes S, Sa-Leao R, van der Heide HG, Schouls LM. 2011. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PloS One* **6**: e19668. doi: 10.1371/journal.pone.0019668.
- Elemfareji OI, Thong KL. 2013. Comparative Virulotyping of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*. *Indian Journal of Microbiology* **53**: 410-417.
- Elliott SD. 1966. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM *Streptococcus*). *The Journal of Hygiene* **64**: 205-212.
- Enright MR, Alexander TJ, Clifton-Hadley FA. 1987. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. *The Veterinary Record* **121**: 132-133.
- Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M. 2008. Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology* **154**: 2668-2679.

- Esgleas M, Domínguez-Punaro M de L, Li Y, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M. 2009. Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiology Letters* **294**: 82-88.
- Escudero JA, San Millán A, Catalán A, de la Campa AG, Rivero E, López G, Domínguez L, Moreno MA, González-Zorn B. 2007. First characterization of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus suis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 777-782.
- Fabisiak M, Kita J, Jedryczko R, Binek M. 2005. Prevalence of the suilysin gene in *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **8**: 141-145.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* **186**: 1518-1530.
- Feng Y, Zheng F, Pan X, Sun W, Wang C, Dong Y, Ju AP, Ge J, Liu D, Liu C, Yan J, Tang J, Gao GF. 2007. Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters* **275**: 80-88.
- Feng Y, Pan X, Sun W, Wang C, Zhang H, Li X, Ma Y, Shao Z, Ge J, Zheng F, Gao GF, Tang J. 2009a. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *The Journal of Infectious Diseases* **200**: 1583-1592.
- Feng Y, Shi X, Zhang H, Zhang S, Ma Y, Zheng B, Han H, Lan Q, Tang J, Cheng J, Gao GF, Hu Q. 2009b. Recurrence of human *Streptococcus suis* infections in 2007: three cases of meningitis and implications that heterogeneous *S. suis* 2 circulates in China. *Zoonoses and Public Health* **56**: 506-514.
- Feng Y, Cao M, Shi J, Zhang H, Hu D, Zhu J, Zhang X, Geng M, Zheng F, Pan X, Li X, Hu F, Tang J, Wang C. 2012. Attenuation of *Streptococcus suis* virulence by the alteration of bacterial surface architecture. *Scientific Reports* **2**: 710. doi: 10.1038/srep00710.
- Feng Y, Zhang H, Wu Z, Wang S, Cao M, Hu D, Wang C. 2014. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?. *Virulence* **5**: 477-497.

- Ferrando ML, Fuentes S, de Greeff A, Smith H, Wells JM. 2010. ApuA, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus. *Microbiology* **156**: 2818-2828.
- Ferreira TS, Felizardo MR, Sena de Gobbi DD, Gomes CR, Nogueira Filsner PH, Moreno M, Paixao R, Pereira Jde J, Micke Moreno A. 2012. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in Brazil. *The Scientific World Journal* **2012**: 68502. doi:10.1100/2012/685028.
- Field HI, Buntan D, Done JT. 1954. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. *Veterinary Record* **66**:454-455.
- Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, de la Cruz Domínguez-Punaro M, Harel J, Bui NK, Vollmer W, Gottschalk M. 2008a. Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Molecular Microbiology* **70**: 1120-1135.
- Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Harel J, Domínguez-Punaro Mde L, Von Aulock S, Draing C, Marois C, Kobisch M, Gottschalk M. 2008b. D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity* **76**: 3587-3594.
- Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, Lowery DE, Gottschalk M. 2009. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and sulysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Veterinary Microbiology* **139**: 310-317.
- Fittipaldi N, Takamatsu D, de la Cruz Domínguez-Punaro M, Lecours MP, Montpetit D, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M. 2010. Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis* srtF cluster result in pili formed by the major subunit only. *PLoS One* **5**: e8426. doi: 10.1371/journal.pone.0008426.
- Fittipaldi N, Xu J, Lacouture S, Tharavichitkul P, Osaki M, Sekizaki T, Takamatsu D, Gottschalk M. 2011. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 2239-2244.
- Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiology* **7**: 259-79.
- Flores JL, Higgins R, D'Allaire S, Charette R, Boudreau M, Gottschalk M. 1993. Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. *Canadian Veterinary Journal* **34**: 170-171.

- Fordymacki P, Kochman M, Lawrynowicz-Paciorek M, Kaluzewski S. 1998. Evaluation of the usefulness of selected commercial systems for identification of *Streptococcus* species. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia* **50**: 171-177.
- Galina L, Collins JE, Pijoan C. 1992. Porcine *Streptococcus suis* in Minnesota. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **4**: 195-196.
- Galina L, Pijoan C, Sitjar M, Christianson WT, Rossow K, Collins JE. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *The Veterinary Record* **134**: 60-64.
- Gálvez, L., Belliure, J., Rebollo, S., 2009. European rabbits as ecosystem engineers: warrens increase lizard density and diversity. *Biodiversity and Conservation* **18**: 869-885.
- Ge J, Feng Y, Ji H, Zhang H, Zheng F, Wang C, Yin Z, Pan X, Tang J. 2009. Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome. *Current Microbiology* **59**: 248-255.
- Gilbert FB, Fromageau A, Lamoureux J, Poutrel B. 2006. Evaluation of tandem repeats for MLVA typing of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research* **2**: 33. doi:10.1186/1746-6148-2-33
- Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J. 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research* **53**: 241-256
- Gortázar C, Vicente J, Boadella M, Ballesteros C, Galindo RC, Garrido J, Aranaz A, de la Fuente J. 2011. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary Microbiology* **151**: 170-178.
- Gottschalk, M., 2012. Streptococcosis. En: Diseases of Swine, 10<sup>a</sup> ed. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G. (Eds.). Blackwell Publishing, West Sussex, pp. 841-855.
- Gottschalk M, Segura M. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary Microbiology* **76**: 259-272.
- Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* **27**: 2633-2636.
- Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J. 1991a. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **3**: 60-65.

- Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J. 1991b. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* **29**: 2590-2594.
- Gottschalk M, Turgeon P, Higgins R, Beaudoin M, Bourgault AM. 1991c. Susceptibility of *Streptococcus suis* to penicillin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **3**: 170-172.
- Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. 1993. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* **31**: 2192-2194.
- Gottschalk M, Lacouture S, Dubreuil JD. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141**: 189-195.
- Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil JD, Smith H, Vecht U. 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Canadian Journal of Veterinary Research* **62**: 75-79.
- Gottschalk M, Higgins R, Quessy S. 1999. Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 4202-4203.
- Gottschalk M, Segura M, Xu J. 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews* **8**: 29-45.
- Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiology* **5**: 371-391.
- Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D. 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. *Veterinary Microbiology* **162**: 819-825.
- Grebe T, Bergenthal D, Fahr AM, Scheja HW. 1997. Meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2 in an adult. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **122**: 1244-1247.
- Guisse HJ, Penny RH, Petherick DJ. 1986. Streptococcal meningitis in pigs: field trial to study the prophylactic effect of trimethoprim/sulphadiazine medication in feed. *The Veterinary Record* **119**: 395-400.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?. *Veterinary Microbiology* **100**: 255-268.
- Haguenoer E, Baty G, Pourcel C, Lartigue MF, Domelier AS, Rosenau A, Quentin R, Mereghetti L, Lanotte P. 2011. A multi locus variable number of tandem repeat

- analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiology* **11**: 171. doi: 10.1186/1471-2180-11-171.
- Halaby T, Hoitsma E, Hupperts R, Spanjaard L, Luirink M, Jacobs J. 2000. *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **19**: 943-945.
- Haleis A, Alfa M, Gottschalk M, Bernard K, Ronald A, Manickam K. 2009. Meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 14, North America. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 350-352.
- Hampson DJ, Trott DJ, Clarke IL, Mwaniki CG, Robertson ID. 1993. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* **31**: 2895-2900.
- Han DU, Choi C, Ham HJ, Jung JH, Cho WS, Kim J, Higgins R, Chae C. 2001. Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughter pigs in Korea. *Canadian Journal of Veterinary Research* **65**: 151-155.
- Harel J, Higgins R, Gottschalk M, Bigras-Poulin M. 1994. Genomic relatedness among reference strains of different *Streptococcus suis* serotypes. *Canadian Journal of Veterinary Research* **58**: 259-262.
- Heath PJ, Hunt BW, Duff JP, Wilkinson JD. 1996. *Streptococcus suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *The Veterinary Record* **139**: 450-451.
- Higgins R, Gottschalk M. 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **2**: 249-252.
- Higgins R, Gottschalk M. 2006. Streptococcal Diseases. En: Diseases of Swine, 9<sup>a</sup> ed. Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 769-783.
- Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J. 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **7**: 405-406.
- Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Veterinary Microbiology* **107**: 63-69.
- Hoa NT, Chieu TTB, Nga TTT, Dung NV, Campbell J, Anh PH, Tho HH, Chau NVV, Bryant JE, Hien TT, Farrar J, Schultz C. 2011. Slaughterhouse pigs are a major

- reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam. *PLoS One* **6**:e17943. doi: 10.1371/journal.pone.0017943.
- Hommez J, Devriese LA, Henrichsen J, Castryck F. 1986. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology* **11**: 349-355.
- Hommez J, Wullepit J, Cassimon P, Castryck F, Ceyssens K, Devriese LA. 1988. *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *The Veterinary Record* **123**: 626-627.
- Hsueh KJ, Lee JW, Hou SM, Chen HS, Chang TC, Chu CY. 2013. Evaluation on a *Streptococcus suis* Vaccine Using Recombinant Sao-L Protein Manufactured by Bioreactors as the Antigen in Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases* **61**:35-43.
- Hu Y, Li B, Jin D, Cui Z, Tao X, Zhang B, Zhang J. 2013. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis typing of *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 1263-1268.
- Hui AC, Ng KC, Tong PY, Mok V, Chow KM, Wu A, Wong LK. 2005. Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience. *Clinical Neurology and Neurosurgery* **107**: 366-370.
- Iglesias JG, Trujano M, Xu J. 1992. Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with pseudorabies virus. *American Journal of Veterinary Research* **53**: 364-367.
- Ip M, Fung KS, Chi F, Cheuk ES, Chau SS, Wong BW, Lui S, Hui M, Lai RW, Chan PK. 2007. *Streptococcus suis* in Hong Kong. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **57**: 15-20.
- Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK. 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity* **62**: 1742-1748.
- Jacobs AA, van den Berg AJ, Baars JC, Nielsen B, Johannsen LW. 1995. Production of suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. *The Veterinary Record* **137**: 295-296.
- Jacobs AA, van den Berg AJ, Loeffen PL. 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *The Veterinary Record* **139**: 225-228.

- Jensen J, van Dorssen CA. 1951. Meningo-encephalitis bij vafkens door streptococcen. *Tijdschrift voor Diergeneeskund* **76**: 815-832.
- Jobin MC, Grenier D. 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters* **220**: 113-119.
- Jobin MC, Brassard J, Quessy S, Gottschalk M, Grenier D. 2004. Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity* **72**: 606-610.
- Jobin MC, Fortin J, Willson PJ, Gottschalk M, Grenier D. 2005a. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiology Letters* **252**: 105-111.
- Jobin MC, Martinez G, Motard J, Gottschalk M, Grenier D. 2005b. Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology* **187**: 795-799.
- Kataoka Y, Haritani M, Mori M, Kishima M, Sugimoto C, Nakazawa M, Yamamoto K. 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *The Journal of Veterinary Medical Science* **53**: 1043-1049.
- Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, Morozumi T, Kashiwazaki M. 1993. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan farms from 1987 to 1991. *The Journal of Veterinary Medical Science* **55**: 623-626.
- Kataoka Y, Yoshida T, Sawada T. 2000. A 10-year survey of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from swine in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* **62**: 1053-1057.
- Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiernemann C. 1998. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *The Journal of Experimental Medicine* **188**: 305-315.
- Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, Nakamura S, Uchida R, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. 2009. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *Journal of Medical Microbiology* **58**: 1508-1513.



- Kerdsin A, Dejsirilert S, Sawanpanyalert P, Boonnark A, Noithachang W, Sriyakum D, Simkum S, Chokngam S, Gottschalk M, Akeda Y, Oishi K. 2011a. Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. *The Lancet* **378**:960.
- Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, Oishi K. 2011b. Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 835-842.
- Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding DN, McDonald LC. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 431-437.
- King SJ, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM. 2001. Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infection and Immunity* **69**: 7572-7582.
- King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM. 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3671-3680.
- Kilpper-Balz R, Schleifer, KH. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**: 160-162.
- Lakkitjaroen N, Takamatsu D, Okura M, Sato M, Osaki M, Sekizaki T. 2011. Loss of capsule among *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its biological significance. *Journal of Medical Microbiology* **60**: 1669-1676.
- Lamont MH, Edwards PT, Windsor RS. 1980. Streptococcal meningitis in pigs: results of a five-year survey. *The Veterinary Record* **107**: 467-469.
- Langford P, Williams AE, Kroll JS. 1991. Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS Microbiology Letters* **61**: 347-350.

- Lebel G, Piche F, Frenette M, Gottschalk M, Grenier D. 2013. Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides* **50**:19-23.
- Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M. 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *The Journal of Infectious Diseases* **204**: 919-929.
- Li M, Wang C, Feng Y, Pan X, Cheng G, Wang J, Ge J, Zheng F, Cao M, Dong Y, Liu D, Wang J, Lin Y, Du H, Gao GF, Wang X, Hu F, Tang J. 2008. SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2. *PloS One* **3**: e2080. doi: 10.1371/journal.pone.0002080.
- Li J, Tan C, Zhou Y, Fu S, Hu L, Hu J, Chen H, Bei W. 2011. The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2. *Veterinary Microbiology* **148**: 99-104.
- Li W, Ye C, Jing H, Cui Z, Bai X, Jin D, Zheng H, Zhao A, Xu Y, Gottschalk M, Xu J. 2010. *Streptococcus suis* outbreak investigation using multiple-locus variable tandem repeat number analysis. *Microbiology and Immunology* **54**: 380-388.
- Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, Jacques M, Harel J. 2006. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infection and Immunity* **74**: 305-312.
- Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P, Harel J. 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology* **14**: 937-943.
- Liang SY, Watanabe H, Terajima J, Li CC, Liao JC, Tung SK, Chiou CS. 2007. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Shigella sonnei*. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 3574-3580.
- Lindstedt BA, Tham W, Danielsson-Tham ML, Vardund T, Helmersson S, Kapperud G. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of Microbiological Methods* **72**: 141-148.

- Liu Z, Zheng H, Gottschalk M, Bai X, Lan R, Ji S, Liu H, Xu J. 2013. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*. *PLoS One* **8**: e72070. doi: 10.1371/journal.pone.0072070.
- López-Bote CJ. 1998. Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat science* **49**, **S1**: S17-27.
- Luey CK, Chu YW, Cheung TK, Law CC, Chu MY, Cheung DT, Kam KM. 2007. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of Microbiological Methods* **68**: 648-650.
- Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ. 2003. Role of suisysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microbial Pathogenesis* **34**: 27-37.
- Luque I, Tarradas C, Astorga R, Perea A, Wisselink HJ, Vecht U. 1999. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Research in Veterinary Science* **66**: 69-72.
- Luque I, Blume V, Borge C, Vela AI, Perea JA, Márquez JM, Fernández-Garayzábal JF, Tarradas C. 2010. Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. *Veterinary Journal* **186**: 396-398.
- Maâtallah M, Bakhrouf A, Habeeb MA, Turlej-Rogacka A, Iversen A, Pourcel C, Sioud O, Giske CG. 2013. Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with multi-locus sequence typing. *PLoS One* **8**: e82069. doi: 10.1371/journal.pone.0082069.
- MacInnes JI, Desrosiers R. 1999. Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Canadian Journal of Veterinary Research* **63**: 83-89.
- Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh NT, Hien TT, Farrar J, Schultsz C. 2008. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 659-667.
- Maio E, Carta T, Balseiro A, Sevilla IA, Romano A, Ortiz JA, Vieira-Pinto M, Garrido JM, de la Lastra JM, Gortázar C. 2011. Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Research in Veterinary Science* **91**: 212-218.

- Marie J, Morvan H, Berthelot-Hérault F, Sanders P, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV, Jouy E, Kobisch M. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**:201-209.
- Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M. 2006. Molecular characterization of *Streptococcus suis* strains by 16S-23S intergenic spacer polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Canadian Journal of Veterinary Research* **70**: 94-104.
- Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M. 2007. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Canadian Journal of Veterinary Research* **71**: 14-22.
- Martel A, Baele M, Devriese LA, Goossens H, Wisselink HJ, Decostere A, Haesebrouck F. 2001. Prevalence and mechanism of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus suis* isolates. *Veterinary Microbiology* **83**: 287-297.
- Martínez G, Harel J, Lacouture S, Gottschalk M. 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Canadian Journal of Veterinary Research* **66**: 240-248.
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infectious Diseases* **17**: 153-162.
- Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **364**: 2697-2707.
- Mennerat A, Nilsen F, Ebert D, Skorping A. 2010. Intensive farming: evolutionary implications for parasites and pathogens. *Evolutionary Biology* **37**: 59-67.
- Mentlein R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides* **85**: 9-24.
- Messier S, Lacouture S, Gottschalk M. 2008. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. *Canadian Journal of Veterinary Research* **49**: 461-462.
- Mogollon JD, Pijoan C, Murtaugh MP, Kaplan EL, Collins JE, Cleary PP. 1990. Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* **28**: 2462-2466.

- Moreau A, Higgins R, Bigras-Poulin M, Nadeau M. 1989. Rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in weaned pigs. *American Journal of Veterinary Research* **50**: 1667-1671.
- Moser SA, Box MJ, Patel M, Amaya M, Schelonka R, Waites KB. 2009. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* discriminates within USA pulsed-field gel electrophoresis types. *The Journal of Hospital Infection* **71**: 333-339.
- Moxon ER, Rainey PB, Nowak MA, Lenski RE. 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology* **4**: 24-33
- Muckle A, Giles J, Lund L, Stewart T, Gottschalk M. 2010. Isolation of *Streptococcus suis* from the urine of a clinically ill dog. *Canadian Journal of Veterinary Research* **51**: 773-774.
- Neis C, Rohde J, Valentin-Weigand P, Baums CG. 2007. Investigation of a possible chain of *Streptococcus suis* infection in a pig breeding community using PCR-based genotyping. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* **120**: 202-206.
- Neuhaus FC, Baddiley J. 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 686-723.
- Nghia HD, Hoa NT, Linh le D, Campbell J, Diep TS, Chau NV, Mai NT, Hien TT, Spratt B, Farrar J, Schultz C. 2008. Human case of *Streptococcus suis* serotype 16 infection. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 155-157.
- Norton PM, Rolph C, Ward PN, Bentley RW, Leigh JA. 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **26**: 25-35.
- Nowrouzian FL, Karami N, Welinder-Olsson C, Ahren C. 2013. Virulence gene typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a complement in epidemiological typing. *Journal of Microbiological Methods* **93**: 173-176.
- Okwumabua O, Chinnapakkagari S. 2005. Identification of the gene encoding a 38-kilodalton immunogenic and protective antigen of *Streptococcus suis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**: 484-490.
- Okwumabua O, Staats J, Chengappa MM. 1995. Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping). *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 968-972.

- Okwumabua O, Abdelmagid O, Chengappa MM. 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiology Letters* **181**: 113-121.
- Okwumabua O, Persaud JS, Reddy PG. 2001. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **8**: 251-257.
- Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* **218**: 79-84.
- Onteniente L, Brisse S, Tassios PT, Vergnaud G. 2003. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4991-4997.
- Osaki M, Takamatsu D, Shimoji Y, Sekizaki T. 2003. Allelic variation in *srtA*s of *Streptococcus suis* strains. *FEMS Microbiology Letters* **219**: 195-201.
- Pan X, Ge J, Li M, Wu B, Wang C, Wang J, Feng Y, Yin Z, Zheng F, Cheng G, Sun W, Ji H, Hu D, Shi P, Feng X, Hao X, Dong R, Hu F, Tang J. 2009. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of Bacteriology* **191**: 2601-2612.
- Parra A, Larrasa J, García A, Alonso JM, de Mendoza JH. 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Veterinary Microbiology* **110**: 293-300.
- Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K. 1968. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **74**: 69-76.
- Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J. 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* **17**: 993-996.
- Perea A, Tarradas C, Vela AI, Goyache J, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF, Borge C, Huerta B, Luque L. 2003. Formas clínicas y variaciones en la distribución de serotipos en la infecciones por *Streptococcus suis* en España. *Anaporc* **238**: 6-14.

- Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiology* **4**: 22. doi:10.1186/1471-2180-4-22.
- Prieto C, Pena J, Suárez P, Imaz M, Castro JM. 1993. Isolation and distribution of *Streptococcus suis* capsular types from diseased pigs in Spain. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **40**: 544-548.
- Principalli MS, Palmieri C, Magi G, Vignaroli C, Manzin A, Camporese A, Barocci S, Magistrali C, Facinelli B. 2009. Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007). *Eurosurveillance* **14**: 19310.
- Quiles A, Otal J, Cubero MJ. 2008. Programas vacunales en explotaciones porcinas. *Producción Animal*. **243**: 25-38.
- Rasmussen SR, Aarestrup FM, Jensen NE, Jorsal SE. 1999. Associations of *Streptococcus suis* serotype 2 ribotype profiles with clinical disease and antimicrobial resistance. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 404-408.
- Reams RY, Glickman LT, Harrington DD, Bowersock TL, Thacker HL. 1993. *Streptococcus suis* infection in swine: a Retrospective study of 256 cases. Part I. Epidemiologic factors and antibiotic susceptibility patterns. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **5**: 363-367.
- Reams RY, Glickman LT, Harrington DD, Thacker HL, Bowersock TL. 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **6**: 326-334.
- Reams RY, Harrington DD, Glickman LT, Thacker HL, Bowersock TL. 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **8**: 119-121.
- Rehm T, Baums CG, Strommenger B, Beyerbach M, Valentin-Weigand P, Goethe R. 2007. Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 102-109.
- Roberts NE, Almond GW. 2003. Infection of growing swine with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*--effects on growth, serum metabolites, and insulin-like growth factor-I. *Canadian Journal of Veterinary Research* **44**: 31-37.

- Robertson ID, Blackmore DK. 1989. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *The Veterinary Record* **124**: 391-394.
- Roels S, Devroye O, Buys H, Smith H, Butaye P. 2009. Isolation of *Streptococcus suis* from a cat with meningoencephalitis. *Veterinary Microbiology* **136**: 206-207.
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* **9**: 29-33.
- Rosenkranz M, Elsner HA, Sturenburg HJ, Weiller C, Rother J, Sobottka I. 2003. *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. *Journal of Neurology* **250**: 869-870.
- Roy D, Fittipaldi N, Dumesnil A, Lacouture S, Gottschalk M. 2014. The protective protein Sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbial Pathogenesis* **67-68**: 31-35.
- Rui P, Zhang ZZ, Ma ZJ, Fang H, Yang WJ, Zhang XZ, Chen J and Jia QH. 2012. Detection of virulence-associated factors of *Streptococcus suis* serotype 2 by PCR assay in Hebei, Province of China. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 1061-1064.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijl J, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance* **18**: 20380.
- Sáez-Royuela C, Tellería JL. 1986. The increased population of wild boar (*Sus scrofa*) in Europa. *Mammal Review*. **16**: 97-101.
- Salasia SI, Lammler C, Devriese LA. 1994. Serotypes and putative virulence markers of *Streptococcus suis* isolates from cats and dogs. *Research in Veterinary Science* **57**: 259-261.
- Sawires YS, Songer JG. 2005. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* **11**: 262-272.
- Schierack P, Rödiger S, Kuhl C, Hiemann R, Roggenbuck D, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B, Römer A, Frömmel U, Wieler LH, Schröder C. 2013. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. *PloS One* **8**: e59242. doi: 10.1371/journal.pone.0059242.



- Schmid S, O'Connor M, Okwumabua O. 2011. The pathogenicity island-like DNA segment associated with Chinese outbreak strain of *Streptococcus suis* serotype 2 is absent in the United States isolates. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* **2**: 56-60.
- Schultsz C, Jansen E, Keijzers W, Rothkamp A, Duim B, Wagenaar JA, van der Ende A. 2012. Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PLoS One* **7**: e33854. doi: 10.1371/journal.pone.0033854.
- Segers RP, Kenter T, de Haan LA, Jacobs AA. 1998. Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiology Letters* **167**: 255-261.
- Segura M, Gottschalk M, Olivier M. 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infection and Immunity* **72**: 5322-5330.
- Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, Gottschalk M. 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **47**: 92-106.
- Si Y, Yuan F, Chang H, Liu X, Li H, Cai K, Xu Z, Huang Q, Bei W, Chen H. 2009. Contribution of glutamine synthetase to the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary Microbiology* **139**: 80-88.
- Sihvonen L, Kurl DN, Henrichsen J. 1988. *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica* **29**: 9-13.
- Sihvonen LM, Toivonen S, Haukka K, Kuusi M, Skurnik M, Siitonen A. 2011. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimination of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. *BMC Microbiology* **11**: 42. doi: 10.1186/1471-2180-11-42.
- Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology* **115**: 117-127.
- Smith HE, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and Immunity* **60**: 2361-2367.

- Smith HE, Reek FH, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA. 1993. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infection and Immunity* **61**: 3318-3326.
- Smith HE, Vecht U, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Biermann Y, Smits MA. 1996. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infection and Immunity* **64**: 4409-4412.
- Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA. 1999a. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infection and Immunity* **67**: 1750-1756.
- Smith HE, Veenbergen V, van der Velde J, Damman M, Wisselink HJ, Smits MA. 1999b. The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: Development of rapid serotype-specific PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 3146-3152.
- Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary Research Communications* **21**: 381-407.
- Staats JJ, Plattner BL, Nietfeld J, Dritz S, Chengappa MM. 1998. Use of ribotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 15-19.
- Staats JJ, Plattner BL, Stewart GC, Changappa MM. 1999. Presence of the *Streptococcus suis* suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Veterinary Microbiology* **70**: 201-211.
- Sorensen, U.B., Poulsen, K., Ghezso, C., Margarit, I., Kilian, M., 2010. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *mBio* **1**: e00178-10. doi: 10.1128/mBio.00178-10.
- Taipa R, Lopes V, Magalhaes M. 2008. *Streptococcus suis* meningitis: first case report from Portugal. *The Journal of Infection* **56**: 482-483.
- Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M, Nishino H, Ishiji T, Tharavichitkul P, Khantawa B, Fongcom A, Takai S, Sekizaki T. 2008. *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 181-183.
- Takamatsu D, Nishino H, Ishiji T, Ishii J, Osaki M, Fittipaldi N, Gottschalk M, Tharavichitkul P, Takai S, Sekizaki T. 2009. Genetic organization and preferential

- distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology* **138**: 132-139.
- Takeuchi D, Kerdsin A, Pienpringam A, Loetthong P, Samerchea S, Luangsuk P, Khamisara K, Wongwan N, Areeratana P, Chiranairadul P, Lertchayanti S, Petcharat S, Yowang A, Chaiwongsaen P, Nakayama T, Akeda Y, Hamada S, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. 2012. Population-based study of *Streptococcus suis* infection in humans in Phayao Province in northern Thailand. *PLoS One* **7**: e31265. doi: 10.1371/journal.pone.0031265.
- Tan C, Fu S, Liu M, Jin M, Liu J, Bei W, Chen H. 2008a. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary Microbiology* **130**: 363-370.
- Tan C, Liu M, Jin M, Liu J, Chen Y, Wu T, Fu T, Bei W, Chen H. 2008b. The key virulence-associated genes of *Streptococcus suis* type 2 are upregulated and differentially expressed in vivo. *FEMS Microbiology Letters* **278**: 108-114.
- Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Wang H, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao GP, Wang Y, Wang X, Chen Z, Gao GF. 2006. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Medicine* **3**: e151. doi: 10.1371/journal.pmed.0030151.
- Tang Y, Zhao H, Wu W, Wu D, Li X, Fang W. 2011. Genetic and virulence characterization of *Streptococcus suis* type 2 isolates from swine in the provinces of Zhejiang and Henan, China. *Folia Microbiologica* **56**: 541-548.
- Tarradas C. 2003. Nuevos conocimientos sobre patologías asociadas a *Streptococcus suis*. *Producción Animal*. **18**: 4-21
- Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, Luque I, Miranda A, Perea A. 1994. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 578-580.
- Tarradas C, Borge C, Arenas A, Maldonado A, Astorga R, Miranda A, Luque I. 2001a. Suilysin production by *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs in Spain. *The Veterinary Record* **148**: 183-184.
- Tarradas C, Luque I, de Andres D, Abdel-Aziz Shahein YE, Pons P, Gonzalez F, Borge C, Perea A. 2001b. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis*

- isolates. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **48**: 347-355.
- Tarradas C, Perea A, Vela AI, Goyache J, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF, Borge C, Huerta B, Luque I. 2004. Distribution of serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Spain. *The Veterinary Record* **154**: 665-666.
- Thanawongnuwech R, Brown GB, Halbur PG, Roth JA, Royer RL, Thacker BJ. 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Veterinary Pathology* **37**: 143-152.
- Tian Y, Aarestrup FM, Lu CP. 2004. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Veterinary Microbiology* **103**: 55-62.
- Tien le HT, Nishibori T, Nishitani Y, Nomoto R, Osawa R. 2013. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and sodA and recN phylogenies. *Veterinary Microbiology* **162**: 842-849.
- Tien YY, Ushijima H, Mizuguchi M, Liang SY, Chiou CS. 2012. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis in molecular subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. *Journal of Medical Microbiology* **61**: 223-232.
- Turner KM, Feil EJ. 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**: 129-135.
- Urwin R, Maiden MC. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* **11**: 479-487.
- Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G, Gottschalk M. 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **35**: 49-58.
- van Cuyck H, Pichon B, Leroy P, Granger-Farbos A, Underwood A, Soullie B, Koeck JL. 2012. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with multiple loci sequence typing. *BMC Microbiology* **12**: 241. doi: 10.1186/1471-2180-12-241.
- van Ham SM, van Alphen L, Mooi FR, van Putten JP. 1993. Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell* **73**: 1187-1196.

- Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M. 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity* **72**: 1441-1449.
- Vanier G, Segura M, Gottschalk M. 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Canadian Journal of Veterinary Research* **71**: 81-89.
- Vanier G, Sekizaki T, Domínguez-Punaro MC, Esgleas M, Osaki M, Takamatsu D, Segura M, Gottschalk M. 2008. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Veterinary Microbiology* **127**: 417-424.
- Vázquez JA, Berrón S. 2004. Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **22**: 113-120.
- Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE. 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and Immunity* **59**: 3156-3162.
- Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, Smith HE. 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infection and Immunity* **60**: 550-556.
- Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Tetenburg BJ, Wisselink HJ, Smith HE. 1997. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Veterinary Microbiology* **58**: 53-60.
- Vela AI, Goyache J, Tarradas C, Luque I, Mateos A, Moreno MA, Borge C, Perea JA, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal Clinical Microbiology* **41**: 2498-2502.
- Vela AI, Pérez M, Zamora L, Palacios L, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 2010. *Streptococcus porci* sp. nov., isolated from swine sources. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **60**: 104-108.
- Vela AI, Sánchez V, Mentaberre G, Lavín S, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 2011. *Streptococcus porcorum* sp. nov., isolated from domestic and wild pigs. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **61**: 1585-1589.

- Wang K, Lu C. 2007. Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift* **120**: 207-209.
- Wang C, Li M, Feng Y, Zheng F, Dong Y, Pan X, Cheng G, Dong R, Hu D, Feng X, Ge J, Liu D, Wang J, Cao M, Hu F, Tang J. 2009. The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Archives of Microbiology* **191**: 23-33.
- Wang HM, Ke CW, Pan WB, Ke BX, Chen JD, Deng XL, Liu MZ, Chen GR, Yang XF, Zhu ZY. 2008. MLST typing of *Streptococcus suis* isolated from clinical patients in Guangdong Province in 2005. *Journal of Southern Medical University* **28**: 1438-1441.
- Wang KC, Zhang W, Li XC, Lu CP, Chen JM, Fan WX, Huang BX. 2013. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from slaughter swine. *Current Microbiology* **66**: 344-349
- Wang S, Liu P, Li C, Tan Y, Cai X, Zhou D, Jiang Y. 2012. Isolation and characterization of 89K pathogenicity island-positive ST-7 strains of *Streptococcus suis* serotype 2 from healthy pigs, Northeast China. *The Scientific World Journal* **2012**: 302386. doi: 10.1100/2012/302386.
- Wang Y, Zhang W, Wu Z, Zhu X, Lu C. 2011. Functional analysis of *luxS* in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. *Veterinary Microbiology* **152**: 151-160.
- Wei ZG, Li R, Zhang AD, He HK, Hua YF, Xia J, Cai XH, Chen HC, Jin ML. 2009. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Veterinary Microbiology* **137**: 196-201.
- Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C. 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clinical Infectious Diseases* **48**: 617-625.
- Whiley R A, Hardie J M. 2009. Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22<sup>AL</sup>. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>a</sup> ed. De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K H, Whitman W B (Eds). Springer, New York, pp. 655–711.
- Wilson TL, Jeffers J, Rapp-Gabrielson VJ, Martin S, Klein LK, Lowery DE, Fuller TE. 2007. A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary Microbiology* **122**: 135-145.

- Windsor RS. 1977. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type II. *The Veterinary Record* **101**: 378-379.
- Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U. 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary Microbiology* **74**: 237-248.
- Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. 2001. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *The Veterinary Record* **148**: 473-477.
- Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. 2002. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2922-2929.
- Witonski D, Stefanova R, Ranganathan A, Schutze GE, Eisenach KD, Cave MD. 2006. Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3849-3854.
- Wu T, Chang H, Tan C, Bei W, Chen H. 2009. The orphan response regulator RevSC21 controls the attachment of *Streptococcus suis* serotype-2 to human laryngeal epithelial cells and the expression of virulence genes. *FEMS Microbiology Letters* **292**: 170-181.
- Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, Kan B, Wang L, Bai X, Zhou Y, Cui Z, Zhang S, Jin D, Sun N, Luo X, Zhang J, Gong Z, Wang X, Wang L, Sun H, Li Z, Sun Q, Liu H, Dong B, Ke C, Yuan H, Wang H, Tian K, Wang Y, Gottschalk M, Xu J. 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases* **12**: 1203-1208.
- Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, Wang S, Liu L, Zu R, Luo L, Xiang N, Liu H, Liu X, Shu Y, Lee SS, Chuang SK, Wang Y, Xu J, Yang W. 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases* **12**: 914-920.
- Zhang A, Chen B, Mu X, Li R, Zheng P, Zhao Y, Chen H, Jin M. 2009a. Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine* **27**: 1348-1353.

- Zhang A, Mu X, Chen B, Liu C, Han L, Chen H, Jin M. 2010. Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology* **140**: 171-175.
- Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H, Jin M. 2011. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology* **148**: 436-439.
- Zhang XH, He KW, Duan ZT, Zhou JM, Yu ZY, Ni YX, Lu CP. 2009b. Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2. *Microbial Pathogenesis* **47**: 267-273.
- Zheng F, Ji H, Cao M, Wang C, Feng Y, Li M, Pan X, Wang J, Qin Y, Hu F, Tang J. 2011. Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity* **79**: 1319-1328.
- Zhou J, Zhang X, He K, Wang W, Ni Y, Zhu H, Yu Z, Mao A, Lv L. 2014. Characterization and proteome analysis of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *Current Microbiology* **68**: 663-669.
- Zhu W, Wu C, Sun X, Zhang A, Zhu J, Hua Y, Chen H, Jin M. 2013. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from China. *Veterinary Microbiology* **166**: 527-534.